

PARTIELLE BIOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG
VON GLIOM-ASSOZIIERTEN
ANTIGENEN

Günter Minkus

Disbui.

München

1988



Aus dem
Institut für Tierpathologie der Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Vorstand Prof. Dr. E. Dahme

PARTIELLE BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON GLIOM-ASSOZIIERTEN ANTIGENEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Günter Minkus
aus München

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. E. Dahme

Korreferent: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A	Einleitung und Problemstellung 1
B	Literaturübersicht 3
1.	Entstehung von TAA 3
2.	Antigenität von Hirntumoren 5
3.	Biochemische Analyse von TAA bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs 6
C	Eigene Untersuchungen 9
1.	Material und Methoden 9
1.1	Versuchstiere 9
1.2	Tumoren 9
1.2.1	Primärtumoren 9
1.2.1.1	N79/41 9
1.2.1.2	N166/77 10
1.2.1.3	N422/83 10
1.2.2	Zellkulturen 11
1.3	Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper 12
1.3.1	Immunisierung 12
1.3.2	Milzzellen 12
1.3.3	Serumgewinnung 13
1.3.4	Myelomzellen 13
1.3.5	Mäuseperitonealzellen 14
1.3.6	Zellfusionen 15
1.3.7	Nachweis gliombindender Antikörper 16
1.3.8	Klonierung von Hybridomen 17
1.3.9	Hybridomselektion 18

1.3.10	Gewinnung von serumfreien Hybridomüberständen	20
1.3.11	Bestimmung von Immunglobulinsubklassen und -isotypen	20
1.3.12	Hybridomkonservierung	21
1.3.13	Verwendung weiterer monoklonaler Antikörper	21
1.4	Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern	22
1.5	Darstellung von GAA mit monoklonalen Antikörpern und Immunoblotting	26
1.5.1	Antigenpräparation von Tumorzellen	26
1.5.2	Biochemische Behandlung der Membran- präparation	27
1.5.3	SDS-PAGE	28
1.5.4	Immunoblotting	30
1.5.5	Immunochemischer Nachweis von GAA	31
1.5.6	Molekulargewichtsbestimmung	33
1.6	Immunoaffinitätschromatographie	33
1.6.1	Antigenpräparation	34
1.6.2	Isolierung von GAA	35
2.	Ergebnisse	37
2.1	Lichtmikroskopische Untersuchung der Zellkulturen	37
2.2	Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper	37
2.2.1	Kreuzreaktionen mit neuroektodermalen Tumorzellen verschiedener Spezies	39
2.2.2	Bestimmung von Immunglobulinsubklassen und -isotypen	40
2.3	Transplantationstumoren	41

2.4	Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern und deren Fragmenten	41
2.5	Ergebnisse zum Nachweis von GAA mittels SDS-PAGE und Immunoblotting	44
2.6	Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA mittels Immunoaffinitätschromatographie und SDS-PAGE	48
2.7	Stoffklassenbestimmung	51
D	Diskussion	54
E	Zusammenfassung - Summary	61
F	Literaturverzeichnis	65

Tabellen

Tab.1:	Mittels monoklonaler Antikörper definierte TAA bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs	8
Tab.2:	Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit Gliomzellen der Linie 79FR-G-41 und normalen Rattenzellen	38
Tab.3:	Kreuzreaktion der einzelnen MAK mit verschiedenen Tumorzelllinien	39
Tab.4:	Immunglobulinklassenbestimmung vom MAK	40
Tab.5:	Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA anhand immunochemischer Markierung mittels MAK	44

Abbildungen

Abb.1:	Schematische Darstellung zum Aufbau von biologischen Membranen	4
Abb.2:	Einfaches Modell eines IgG-Moleküls	42
Abb.3:	Schematische Darstellung zur Fragmentation von Maus-IgG-Antikörpern	43
Abb.4:	Darstellung von Maus-IgG-Antikörpern verschiedener Subklassen und deren Fragmenten in einer SDS-PAGE	43
Abb.5:	Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA bei der Tumorzelllinie 77DG-G-166	45
Abb.6:	Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA bei den Tumorzelllinien 83DG-G-422 und 79FR-G-41	46
Abb.7:	Eichgerade mit der Darstellung der Laufstreckenlänge von Standardproteinen und GAA	47
Abb.8:	Radioaktivitätsverteilung von GAA im Polyacrylamidgel nach Affinitätschromatographie mit dem MAK 6EB4 und 77DG-G-166	49
Abb.9:	Radioaktivitätsverteilung von GAA im Polyacrylamidgel nach Affinitätschromatographie mit dem MAK 17EC5 und 83DG-G-422	50
Abb.10:	Immunperoxidasefärbung mittels MAK auf Zellen der Gliomlinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41	52

A Einleitung und Problemstellung

Die antigenen Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe sind quantitativer und qualitativer Natur. Tumor-assoziierte Antigene (TAA) erfüllen somit zwei Kriterien: sie werden von Tumorzellen in größerem Ausmaß, verglichen mit normalen Zellen, gebildet (Birkmayer, 1984), und aufgrund ihrer Existenz kommt es im Tumorträger zur immunologischen Auseinandersetzung mit den Tumorzellen oder deren Extrakten (Millock, 1984). Grundlegende Arbeiten zum Nachweis von TAA wurden von Gross (1943), Foley (1953) und Prehn (1957) geleistet. Transplantationsstudien an syngenesischen Mäusen mit chemisch induzierten Sarkomen erbrachten den Nachweis der Existenz von tumorspezifischen Transplantationsantigenen.

Auch durch Untersuchungen zur humoralen und zellulären Immunreaktion bei Tumorpatienten wurde die Existenz von TAA nachgewiesen. Um die TAA näher zu charakterisieren wurde zunächst mit Seren von Tumorpatienten gearbeitet. Diese in ihrer Zusammensetzung, Affinität und Spezifität sehr heterogenen Antiseren mußten über arbeitstechnisch aufwendige Absorptionsschritte an autologen, allogenen und xenogenen Normalgeweben gereinigt werden, um mit serologischen Methoden TAA zu definieren (Pfreundschuh et al., 1978).

Der entscheidende Fortschritt zum reproduzierbaren und standardisierbaren monospezifischen Nachweis von TAA brachte die Einführung der Hybridomtechnik durch Köhler und Milstein (1975). Sie produzierten monoklonale Antikörper durch Verschmelzung von antigensensibilisierten immunkompetenten Milzzellen mit Myelomzellen und kombinierten so die Merkmale von monospezifischer Immunkompetenz und Immortalität. Mit diesem Nachweis zur Existenz von TAA stellte sich die Frage nach der biochemischen Natur dieser Strukturen und nach de-

ren diagnostischen und therapeutischen Relevanz. Diagnostische Bedeutung haben an TAA bindende monoklonale Antikörper unter anderem beim Nachweis von prämetastatischen Läsionen (Kennett et al., 1980a; Coakham et al., 1984; Cheung et al., 1987) und Metastasen unklaren histologischen Ursprungs (Gatter et al., 1982). Monoklonale Antikörper definieren TAA mit Markerfunktion wie das karzino-embryonale Antigen, das Alpha-Fetoprotein, das ovarialkarzinom-assoziierte Antigen, das Leukämie- oder das Lymphomantigen. Monoklonale Antikörper allein (Bilzer et al., 1984, 1985) oder mit zytotoxischen oder zytostatischen Substanzen gekoppelt werden in der Therapie bei Tumorpatienten eingesetzt (Bourdon et al., 1984; Bullard et al., 1985; Pfizenmaier et al., 1985; Epene-tos et al., 1985; Stavrou et al., 1985, 1986 a,b; Houghton et al., 1986; Vogel, 1987).

Von grundlegender Bedeutung für Therapie und Diagnose ist dabei die Feststellung des spezifischen Bindungsvermögens von monoklonalen Antikörpern an TAA und deren biochemische Charakterisierung, mit der darüberhinaus Kenntnisse über maligne Transformationen auf molekular-zellulärer Ebene gewonnen werden können.

B Literaturübersicht

1. Entstehung von TAA

Das Bauprinzip der Zellmembran von normalen Zellen unterscheidet sich grundsätzlich nicht von dem neoplastisch veränderter Zellen. Die Zellmembranen sind als dynamische zweidimensionale Lösungen von ausgerichteten globulären Proteinen und Lipiden anzusehen (fluid mosaic model, Singer und Nicolson, 1972), an die Kohlenhydrate gekoppelt werden können, wodurch die funktionell bedeutsamen Glykolipide und Glykoproteine entstehen. Diese antigenwirksamen Strukturen sind ungleichmäßig verteilt, sie liegen allerdings in distinkten Bezirken der aus mehreren verschiedenen Membranbereichen zusammengesetzten äußeren Zellmembran (Micheel, 1973). Zellmembranantigene lassen sich in drei Gruppen einteilen. Zum einen sind dies Alloantigene (=Struktur-, Isoantigene), die nicht mit speziellen Funktionen der Zellen in Verbindung stehen und die genetisch fixiert, innerhalb einer Spezies individualspezifisch sind (z.B. Histokompatibilitätsantigene). Zum anderen finden sich Differenzierungsantigene, durch die sich Zellen mit bestimmten Funktionen voneinander unterscheiden. Geordnete Repression und Derepression von Genen steuern die Spezialisierung auf bestimmte Funktionen und damit die Differenzierung der Zellen des Organismus und ihre Integration in ein Gesamtsystem. Zum dritten sind dies TAA, die unabhängig von der Genese des Tumors bei viral, chemisch und physikalisch induzierten und spontan entstandenen Tumoren exprimiert werden. Bei Krebszellen sind Alterationen ihrer Hüllenmembran beschrieben, so die Ausbil-



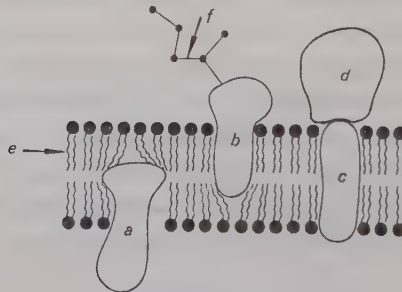
dung neuer und der Verlust normaler Membranantigene, wobei im allgemeinen die Defekte überwiegen (Übersicht bei Birkmayer, 1984).

Als Entstehungsmöglichkeiten werden diskutiert:

- I. durch eine onkogene Virusinfektion hervorgerufene oder mutationsbedingte neue genetische Information
- II. Expression von normaler genetischer Information außerhalb eines zeitlichen oder zellulären Kontext, so die Expression von fetalen Antigenen auf adulten Zellen
- III. Neuordnung oder Modifikation von normalen Zelloberflächenstrukturen aufgrund von Glykosilierung, tumorzell-eigener Proteaseaktivität oder durch innermolekulare Interaktionen aufgrund von Veränderungen der Membranstruktur oder Membranviskosität (Kennett 1980b)

Abb. 1: Schematische Darstellung zum Aufbau von biologischen

Membranen; a, c: integrale Membranproteine; d: peripheres Membranprotein, das an die Oberfläche eines integralen Membranprotein bindet; b: integrales Membranglykoprotein mit f: Kohlenhydratgruppe; e: Phospholipide, die eine Doppelschichtmembran bilden. Die integralen Membranproteine stehen in intensiver Wechselwirkung mit der Lipiddoppelmembran (modifiziert nach Stryer, 1985)



2. Antigenität von Hirntumoren

Es kann als gesichert gelten, daß Tumorzellen gegenüber nicht neoplastisch veränderten Zellen alterierte Antigenstrukturen besitzen (Klein, 1966; Hellström et al., 1968; Old et al., 1969; Bubenik et al., 1970; Warnatz, 1975; Herbermann, 1977; Ghose et al., 1981). Die Expression von TAA als Ausdruck maligner Transformation bei glialen Zellen wurde durch Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunantwort bei spontanen (Wahlström et al., 1973; Solheid et al., 1976; Coakham et al., 1980; Pfreundschuh et al., 1982) und experimentellen Gliomen (Cornain et al., 1978; Stavrou et al., 1978a; Bilzer et al., 1980, 1982) nachgewiesen werden.

TAA werden in drei Klassen eingeteilt (Old, 1981):

Klasse 1: individuell distinkte TAA, die nur auf autologen Tumorzellen vorkommen

Klasse 2: gemeinsame TAA, die auf autologen Tumorzellen und auf Zellen einiger allogener Tumoren vorkommen

Klasse 3: Antigene, die auf verschiedenen normalen und malignen Zellen vorkommen

Neben dieser nach serologischen Kriterien autologer Typisierung aufgestellten Klassifizierung werden humane neuroektodermale Tumoren bezüglich ihrer antigenen Definierbarkeit mit monoklonalen Antikörpern in vier Gruppen eingeteilt (Wikstrand, 1985):

a. biochemisch weitgehend charakterisierte Zellmarker wie GFAP (glial fibrillary acidic protein; Eng et al., 1971) und S-100 (soluble in 100% Ammoniumsulfat; Moore, 1965), Galactocerebrosid und verschiedene Ganglioside in den Zellmembranen von Melanom-, Gliom- und Neuroblastomzellen (Cahan et al., 1982; Pukel et al., 1982; Dippold et al., 1984)

b. gemeinsame Antigene von neuroektodermalen und lymphatischen Zellen (Oger et al., 1982; Seeger et al., 1982; Carrel et al., 1983; Helson et al., 1983)

c. Antigene, die auf neuroektodermalem und auf fetalem Gewebe vorkommen. Hierzu zählen mit denselben monoklonalen Antikörpern kreuzreagierende Antigenstrukturen von Gliomen, Neuroblastomen, Melanomen und Schwannomen (Herlyn et al., 1980; Carrel et al., 1982; de Tribolet, 1982; Saxton et al., 1983) und Antigene, die zugleich auf fetalen Zellen und neurogenen Tumorzellen nachweisbar sind (Kennett et al., 1979; Dippold et al., 1980; Brown et al., 1981; Seeger et al., 1981; Wikstrand et al., 1982)

d. tumorspezifische Antigene, die ausschließlich von einer Tumorzelllinie exprimiert werden. Monoklonale Antikörper, die nur mit einer Tumorzellart reagieren, wurden bei humanen Gliomen von Sikora et al. (1982), bei humanen Melanomen von Houghton et al. (1983) und bei experimentellen Gliomen von Stavrou et al. (1978b) und Lee et al. (1984) beschrieben.

3. Biochemische Analyse von TAA bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs

Durch die Einführung der Hybridomtechnik ist es möglich geworden, einem monospezifischen Antikörper dessen korrespondierende Antigenstruktur zuzuordnen. Diese antikörperdefinierten Antigene konnten biochemisch charakterisiert und so Kenntnisse über Stoffklasse, Molekulargewicht oder Hinweise zum molekularen Aufbau von TAA gewonnen werden. TAA sind bei Lungenkarzinomen (Varki et al., 1984; Ohkubo et al., 1986), Mammakarzinomen (Edwards et al., 1986; Price et al., 1986), Nierenkarzinomen (Ueda et al., 1982; Vessella et

al., 1985; Luner et al., 1986a), Blasenkarzinomen (Masuko et al., 1984; Paulie et al., 1984) oder Colonkarzinomen (Magna-
ni et al., 1981; Blaszczyk et al., 1984; Koprowski et al., 1984) und vielen anderen Neoplastomen biochemisch charakterisiert worden. Bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs standen Melanome aufgrund ihrer Häufigkeit und klinischen Bedeutung beim Menschen im Mittelpunkt der Forschung. Über biochemisch definierte TAA bei Tumoren des Nervensystems wird vergleichsweise wenig berichtet.

Bei Vergleichsstudien des Proteinmusters von normalem und blastomatisiertem Hirngewebe (Astrozytome, Ependymome, Medulloblastome) waren Unterschiede im Vorkommen distinkter Proteinstrukturen festzustellen (Narayan et al., 1986), außerdem wiesen gliom-assoziierte Histokompatibilitätsantigene (Lampson et al., 1986) und Glykosaminoglykane (Bertolotto, 1986) Unterschiede zu Normalgewebe auf. Bei Transplantationsstudien mit Gliosarkomzellen wurde die Existenz eines tumor-assoziierten Transplantationsantigens (TATA) nachgewiesen, dessen Molekulargewicht zwischen 40 und 70 kilodalton (kd) lag. Bei mit diesem TATA immunisierten Tieren konnte nach Inokulation von Gliosarkomzellen kein Tumorstadium beobachtet werden (Khoda, 1986).

Einen Überblick über mittels monoklonaler Antikörper (MAK) biochemisch definierte TAA bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs gibt folgende Tabelle. Dabei ist festzustellen, daß es sich vorwiegend um Proteinstrukturen handelt und sich diese bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften als sehr heterogen präsentieren. Der Nachweis zur Stoffklasse wurde, mit Ausnahme der von den Antikörpern NKI/C-3 und FHK 1 charakterisierten TAA, mit selektiver radioaktiver Markierung der untersuchten Zelllinien oder der MAK geführt. Aufgrund ihres Reaktionsmusters gehören die beschriebenen Antigene zu den TAA der Klasse 2 (Einteilung nach Old, 1981).

Tab.1: Mittels monoklonaler Antikörper (MAK) definierte TAA bei Tumoren neuroektodermalen Ursprungs

MAK	Subklasse	Biochemische Klassifikation der TAA	Immunogen	Kreuzreaktivität mit	Nachweisverfahren	Quelle
GE2	IgG ₁	p 48 kd	Glioblastom	Gliomen, Medulloblastomen, Schwanomen, Meningomen	IP, SDS-PAGE	de Tribolet, 1984
BF7	IgG ₁ , IgG ₂	p 48 kd	Glioblastom	Gliomen, Ependymomen, Meningomen, Melanomen	IP, SDS-PAGE	
217c	n. a.	p 64 kd	Gliom	Oligodendrogliomen, Astrozytomen	IP, SDS-PAGE	Luner, 1985b
81C6	IgG _{2b}	gp 1000 kd	Gliom	Neuroblastomen, Melanomen	SDS-PAGE, IB	Bourdon, 1985
AJ225	IgG ₁	gp 145 kd	Astrozytom	anderen Astrozytomen	IP, SDS-PAGE	Cairncross, 1982
A0122	IgG ₁	gp 265 kd	Astrozytom	anderen Astrozytomen, Melanomen	IP, SDS-PAGE	
AJ10	IgG ₁	gp 165 kd, gp 195 kd	Astrozytom	anderen Astrozytomen, Melanomen	IP, SDS-PAGE	
CE7	IgG ₁	gp 190 kd	Neuroblastom	Gliomen, Melanomen, Phäochromozytomen	SDS-PAGE, IB	Schönmann, 1986
CB10	IgG ₂	gp 180 kd	Neuroblastom	anderen Neuroblastomen	SDS-PAGE, IB	
PI153/3	n.a.	gp 20 kd	Neuroblastom	anderen Neuroblastomen, Gliomen	IAC, SDS-PAGE	Momoi, 1980 Kennett, 1980
UJ127-11	n.a.	gp 220-240 kd	Fötalhirn	Neuroblastomen, Melanomen	IP, SDS-PAGE	Kemshead, 1983
FKH1	IgG _{2b}	p 55 kd, p 77 kd	Melanom	Glioblastomen, Naevi, Phäochromozytomen	SDS-PAGE, IB	Fukaya, 1986
96.5	IgG _{2b}	gp 97 kd	Melanom	Gliomen, Naevi, anderen Melanomen	IP, SDS-PAGE	Brown, 1981 Woodbury, 1980
4.1	IgG ₁	gp 97 kd	Melanom	anderen Melanomen	IP, SDS-PAGE	
118.1	IgG _{2a}	gp 97 kd	Melanom	Fötalhirn	IP, SDS-PAGE	
8.2	IgG ₁	gp 97 kd	Melanom	Fötalhirn	IP, SDS-PAGE	
R24	IgG ₃	Gangliosid D ₃	Melanom	Gliomen, Fötalhirn	DSC, IP	Pukel, 1982
Anti-OFA-I-2	n.a.	Gangliosid D ₂	Melanom	Neuroblastomen, Gliomen, anderen Melanomen	DSC, IP	Cahan, 1982
9.2.27	IgG _{2a}	gp 250 kd, gp >400 kd	Melanom	anderen Melanomen	IP, SDS-PAGE	Bumol, 1982
225.28S	IgG _{2a}	gp 80-280 kd, gp 300-700 kd	Melanom	anderen Melanomen, Naevi	IP, SDS-PAGE	Wilson, 1983
653.40S	IgG ₁	gp 280 kd, gp >500 kd	Melanom	anderen Melanomen	IP, SDS-PAGE	Natali, 1981
NKI/C-3	IgG ₁	gp 25-110 kd	Melanom	anderen Melanomen, Naevi	IAC, GF, SDS-PAGE	Vennegoor, 1985

Abkürzungen: gp - Glykoprotein, kd - kilodalton, n.a. - nicht angegeben, p - Protein, DSC - Dünnschichtchromatographie, GF - Gelfiltration, IAC - Immunoaffinitätschromatographie, IB - Immunoblotting, IP - Immunopräzipitation, SDS-PAGE - Natrium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamidegelelektrophorese

C Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Balb/c-Mäuse beiderlei Geschlechts und Balb/c-nu/nu-Mäuse (thymuslose Nacktmäuse) im Alter von fünf bis zwölf Wochen. Es handelt sich bei diesen Tieren um reine Inzuchtlinien. Sie wurden in Makrolon[®]-Käfigen gehalten. Als Standardfutter erhielten die Balb/c-Mäuse Altromin[®]-1324 und Wasser ad libitum, die Nacktmäuse Altromin[®]-1414 Sonderanfertigung und Wasser ad libitum, das auf pH 3 angesäuert war.

1.2 Tumoren

1.2.1 Primärtumoren

1.2.1.1 N79/41

Das durch Applikation von N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff induzierte Rattengliom N79/41 wurde aus der rechten Großhirnhemisphäre einer Fischer-Ratte isoliert (Stavrou et al., 1983). Der Tumor erreichte Kirschkergröße und besteht histologisch aus pleomorphen, mittelgroßen Zellen mit ovalen bis runden Kernen. Riesenzellen und Mitosen sind häufig. Von den meisten Tumorzellen wird GFAP und Protein S-100 exprimiert. Der Tumor wurde als pleomorphes Astrozytom Grad II klassifiziert.

1.2.1.2 N166/77

Der Spontantumor N 166/77 (Müller, 1978; Dahme et al., 1980) stammt aus dem Gehirn einer 7-jährigen Boxerhündin. Im rechten Lobus piriformis lokalisiert, war er von grau-weißer Farbe, etwa kirschgroß, unscharf vom umgebenden Gewebe abgesetzt und von petechialen Blutungen durchsetzt. Im histologischen Bild besteht der Tumor aus fortsatzreichen bis mittelgroßen Zellen mit rundlichen oder länglich gebogenen Kernen. Kugelblutungen sind im insgesamt lockeren Gewebe häufig zu finden. Bei immunhistochemischen Untersuchungen konnte bei fast allen Zellen das Vorkommen von astrozytenspezifischem GFAP und Protein S-100 nachgewiesen werden. Der Tumor wurde als kleinzelliges, gut differenziertes Astrozytom klassifiziert.

1.2.1.3 N422/83

Der Spontantumor N 422/83 stammt aus der rechten Großhirnhemisphäre einer 5-jährigen Boxerhündin. Er reichte in der Höhe des Sulcus cruciatus vom Seitenventrikel bis zur Meninx. Er war kirschgroß, weißlich und von zerfließlich-sulziger Konsistenz ohne makroskopisch erkennbare Nekrosen. Histologisch stellt sich der Tumor als zellreiches, gut vaskularisiertes Gewebe mit dicht liegenden, durch kurze Fortsätze miteinander verbundenen Zellen dar. So entsteht das Bild eines wabenartigen, feinmaschigen Netzwerkes. Bei immunochemischen Untersuchungen konnte Protein S-100 nicht nachgewiesen werden. GFAP wurde nur von wenigen Zellen exprimiert (Schmitt, 1986). Der Tumor entspricht dem Bild eines Oligodendroglioms Grad III-IV.

1.2.2 Zellkulturen

Von den drei genannten Primärtumorlinien wurden durch Explantation von frischem Tumorgewebe permanente Zelllinien in vitro etabliert: 79FR-G-41 (1979, Fischer-Rat. Glioma, Nr. 41), 77DG-G-166 (1977, Dog, Glioma, Nr. 166) und 83-DG-G-422.

Die Zellen der genannten Gliomlinien wurden in 50 ml Plastikflaschen (Nunc, Roskilde/Dänemark) und in silikonisierten 1 l Glaskulturflaschen im geschlossenen System bei 37° C kultiviert. Das Nährmedium bestand aus 13,4 g/l Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Paisley/Schottland), dem 10% fetales Kälberserum (FKS, Flow, Meckenheim) sowie 0,8 g/l NaHCO₃ (Merck, Darmstadt), 0,1 g/l Neomycin (Sigma, Deisenhofen), 100 000 I.E./l Penicillin G (Sigma), 0,1 g/l Streptomycin (Sigma) zugesetzt worden waren. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,9 eingestellt.

Die in den Plastikflaschen als Monolayer wachsenden Kulturen wurden zweimal pro Woche mit Hilfe einer STV-Lösung (100 ml Saline 10-fach, 25 ml 25% Trysinlösung, 50 ml 0,1% Versenellösung, Aqua bidest ad 1000 ml) im Verhältnis 1:10 bis 1:30 umgesetzt.

Der verbleibende Rest an Tumorzellen wurde in die 1 l Glaskulturflaschen umgesetzt, diese Kultivation diente der Massenzucht von Tumorzellen zur Isolierung von gliomassoziierten Antigenen (GAA). Bei dieser Kultivation wurde Hungernlassen, Kontaktinhibition und Sphäroidbildung der Tumorzellen vermieden, um ihre Antigenexpression innerhalb eines relativ kleinen optimalen Bereichs zu garantieren (Lindmo, 1984). Die Tumorzellen wurden nach maximal vier Tagen aus den Kulturflaschen entnommen, in einem Coulter Counter (Coulter Electronics LTD, Harpenden /Großbritannien) gezählt und in Portionen bis maximal 10⁷ Zellen in

Einfriertubes (Nunc) in Einfriermedium, bestehend aus Nährmedium, 20% FKS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg) nach vier Stunden Vorkühlung bei 4° C bei -80° C tiefgefroren (Ashwood-Smith, 1961).

1.3 Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper

1.3.1 Immunisierung

Die Immunisierung von vier bis zwölf Wochen alten Balb/c-Mäusen erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von Gliomzellen der Linie 79FR-G-41. Die Tiere wurden insgesamt dreimal in wöchentlichen Intervallen mit jeweils 1×10^6 mit Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS, Sigma) modifizierten Zellen (Lemonnier et al., 1977; Stavrou et al., 1981) immunisiert. Der 'Booster', drei Monate nach der letzten Immunisierung, erfolgte dreifach im täglichen Abstand mit 1×10^6 nativen Gliomzellen.

1.3.2 Milzzellen

Zwei Tage nach dem letzten 'Booster' wurden die immunisierten Mäuse euthanasiert und deren Milzen unter sterilen Kautelen entnommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden sie in einer sterilen Petrischale mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch die Maschen eines Siebes (Maschenweite 60 μ m) gedrückt. Das Sieb wurde mit 10 ml DMEM-Lösung/10% FKS abgespült und die Milzzellsuspension in ei-

nem Reagenzglas aufgenommen, mehrmals kräftig suspendiert, und drei Minuten lang stehen gelassen. Nachdem sich größere Milzpartikel abgesetzt hatten, wurden die im Überstand befindlichen Milzzellen abgenommen und 10 min bei 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml DMEM/10% FKS resuspendiert und im Coulter Counter gezählt. Durchschnittlich konnten 10^8 Milzzellen/Milz gewonnen werden.

1.3.3 Serumgewinnung

Sofort nach Euthanasie der Maus, noch vor Entfernung der Milz, wurde die Pleuralhöhle eröffnet und durch Herzpunktion durchschnittlich 1 ml Blut gewonnen. Das darin enthaltene Serum wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 800 g abgetrennt und diente später als Positivkontrolle bei Färbungen auf Zellkulturen.

1.3.4 Myelomzellen

Für die Fusion mit den Milzzellen wurden Zellen der Balb/c-Myelomzelllinie X63-Ag 8.653 verwendet (Kearney et al., 1979). Diese Myelomzellen produzieren einerseits keine nachweisbaren Antikörper, andererseits erfüllen sie als Balb/c-Mäusezellen die Prämisse einer möglichst nahen onto- und phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den Fusionspartnern (Köhler et al., 1978a), und garantieren so optimale Voraussetzungen für ein erfolgreiches Gelingen von Zellfusionen. Die Myelomzellen wurden in 50 ml und 260 ml Pla-

stikflaschen (Nunc) mit DMEM-Nährmedium/20% FKS gezüchtet und im offenen System bei 37° C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Am Tag vor der Fusion wurden sie im Verhältnis 1:2 gesplittet, so daß sie sich in einer optimalen Wachstumsphase befanden.

1.3.5 Mäuseperitonealzellen

Als 'Feeder-layer' für die Hybridome wurden Mäuseperitonealzellen, vorwiegend Makrophagen, benötigt. Balb/c-Mäusen wurden drei Tage vor der Fusion 1,5 ml 10% Thioglycollate-Lösung (Difco Lab. Detroit/USA) intraperitoneal injiziert (Schiemelpfennig et al., 1980). Am Tag vor der Fusion wurden die Tiere mit Äther anästhesiert und durch Genickdislokation getötet. Die desinfizierte Bauchhaut wurde nach einem Einschnitt in der Kniefalte nach kranial abgezogen und die Peritonealhöhle mit 5 ml DMEM-Medium/10% FKS gespült. Die Spülflüssigkeit wurde in einem eisgekühlten Zentrifugenröhrchen gesammelt und 5 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in DMEM-Medium/20% FKS resuspendiert und in einer Dichte von 10⁵ Zellen/Loch auf einer 96-Mikrotiterplatte (Flow) ausgesät und im offenem System bebrütet.

Die Aufgabe der Mäuseperitonealzellen besteht in der Phagozytose von Zelldetritus und der Bildung von proliferationsfördernden Proteinen (Goding, 1980).

1.3.6 Zellfusionen

Die Zellfusionen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Davidson et al. (1976), Galfre et al. (1977), Fazekas de St. Groth et al. (1980) und Peters et al. (1985) durchgeführt. Die Milzzellen und die Myelomzellen wurden im Verhältnis 10:1 gemischt, 5 min lang bei 800 g zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgesaugt. 1 ml des fusionsvermittelnden Polyäthylenglycolls (PEG 1500, Merck) wurde während 1 min auf das Pellet getropft, wobei durch leichtes Schnippen an den Boden des Zentrifugenglases das Zellsediment gelockert wurde und so ein besseres Durchdringen des Polyäthylenglycolls ermöglicht wurde. Nach kurzem ein- bis zweimaligem Resuspendieren wurde eine Minute abgewartet und das PEG im Zeitraum von 10 min durch tropfenweise Zugabe von Fusionsmedium auf ein Gesamtvolumen von 8 ml verdünnt. Das Fusionsmedium bestand aus 450 ml DMEM-Medium, 50 ml NCTC-Nährmedium (Gibco), 5 ml Na-Pyruvat (Gibco), 1 ml Neomycin (Sigma) und 1,75 ml Aqua Versene (Sigma). Nach einer 8-minütigen Zentrifugation bei 800 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in HAT-Selektionsmedium (Littlefield, 1964) resuspendiert (100 ml DMEM, 10 ml NCTC-Nährlösung, 20 ml FKS, 1 ml Na-Pyruvat, 1 ml Aminopterin (Sigma), 1 ml Hypoxanthin/Thymidinlösung (Sigma), 10 000 I.E. Penicillin G, 10 mg Streptomycin und 1 ml 8,8% NaCO_3). Anschließend erfolgte die Inkubation während einer Stunde bei 37° C im offenen System und die Zellen wurden auf den mit feeder-layer vorbereiteten 96-Mikrotiterplatten ausgesät. Pro Platte wurde jeweils eine Reihe mit Myelomzellen als HAT-Wirkungskontrolle angelegt und die Platten bei 37° C

im offenen System bebrütet. Nach jeweils drei Tagen wurden 70% des verbrauchten Mediums abgesaugt und durch frisches HAT-Medium ersetzt. Nach durchschnittlich 9 Tagen waren die Myelomzellen abgestorben und die Zellen wurden nun mit HCM-Medium gefüttert (700 ml DMEM, 100 ml NCTC, 200 ml FKS, 3,7 g NaHCO_3 , 5 ml Na-Pyruvat, 100 000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Streptomycin und 0,1 g Neomycin).

1.3.7 Nachweis gliombindender Antikörper

14 Tage nach der Fusion waren die Hybridome so dicht gewachsen, daß sie auf ihre Antikörperproduktion getestet werden konnten. Die Hybridomklone waren zu diesem Zeitpunkt bereits makroskopisch in den Testplatten sichtbar oder umfaßten mikroskopisch mehr als 100 Zellen. Der Nachweis wurde mit einer indirekten Immunperoxidasefärbung geführt (Pateraki et al., 1981). Hierzu wurden auf 96-Mikrotiterplatten 10^3 Gliomzellen pro Loch in Kulturmedium DMEM/10% FKS ausgesät, 24 Stunden bebrütet, mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert und mit PBS-A gewaschen. Nach einer einstündigen Präinkubation mit 10% Schweinenormalserum zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen wurden die Testplatten mit PBS-A gewaschen und als 1. Antikörper wurde 50 μl unverdünnter Kulturüberstand in die Platten pipettiert, 60 min bei 37° C inkubiert, und dreimal mit PBS-A gewaschen. Als 2. Antikörper wurde Meerrettichperoxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus Ig verwendet (Dakopatts, Hamburg), in einer Verdünnung von 1:100 unter Zusatz von 5% FKS, und ebenfalls 60 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Testplatten sechsmal mit PBS-A gewaschen und die Bindungsreaktion des Antikörpers an die Zielzellen mit dem Substrat nach Nexø (1977) sichtbar gemacht. Als Chromogen diente

eine Lösung von 20 mg. 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol (Sigma) in 5 ml NN'-Dimethylformamid (Merck), die wiederum in 95 ml 50 mM Azetatpuffer, pH 5,0 aufgenommen, filtriert und unmittelbar vor Gebrauch mit 50 µl 30%iger H₂O₂-Lösung versetzt wurde. Nach 10-minütiger Einwirkung des Chromogens war im positiven Fall bereits makroskopisch eine Rotfärbung in der Vertiefung zu erkennen. Zur Entfernung des Chromogens wurden die Testplatten mit PBS-A gewaschen und im Durchlichtmikroskop ausgewertet, dabei wurden vier Intensitätsgrade unterschieden

- (+++) stark positive Reaktion
- (++) positive Reaktion
- (+) schwache Reaktion
- (-) keine Reaktion

Zum Nachweis von gliombindenden Antikörpern auf 'lebenden' Zellen wurde auf die Fixierung verzichtet, die Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt, statt PBS-A wurde allerdings PBS unter Zusatz von Magnesium- und Calciumionen verwendet.

1.3.8 Klonierung von Hybridomen

Sobald positive Hybridome nach dem unter 1.3.7 beschriebenen Screening-verfahren entdeckt wurden, mußten sie, um deren monoklonalen Charakter zu garantieren, nach der Endpunktverdünnungsmethode (Goding, 1980) kloniert werden.

Unter Verwendung von Mäuseperitonealzellen wurden Verdünnungsreihen von 1, 3, 10 Zellen pro Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte ausgesät und jeden 3. Tag mit DMEM/20% FKS gefüttert. Wenn die Hybridomkolonien dicht gewachsen waren, wurden die Überstände erneut mit der indirekten Immunper-

oxidasereaktion getestet und die positiven Kolonien noch zweimal kloniert. Um eine stabile Antikörperproduktion zu gewährleisten, wurde diese Selektion alle vier bis acht Wochen wiederholt.

1.3.9 Hybridomselektion

Nachdem Hybridomklone mit stabiler Antikörperproduktion zur Verfügung standen, wurden diese auf ihr Reaktionsmuster gegenüber Normalgewebe und Tumoren neuroektodermalen Ursprungs überprüft. Zu diesem Zweck wurden die zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen und in vitro kultivierte Zellen anderer Tumoren neuroektodermalen Ursprungs wie unter 1.3.7 behandelt und die Antikörper der Hybridomklone mittels indirekten Immunperoxidasefärbung auf diesen Zellen getestet.

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

79FR-G-41	Astrozytom/Ratte
F98	Glioblastom/Ratte
RG2	Glioblastom/Ratte
77DG-G-166	Astrozytom/Hund
83DG-G-422	Oligodendrogliom/Hund
E251	Melanom/Minipig
85MP-M-198	Melanom/Minipig
B-16	Melanom/Maus
N-59	Glioblastom/Mensch
N-63	Astrozytom/Mensch
N-64	Glioblastom/Mensch
N-66	Astrozytom/Mensch

Als positive Kontrolle dienten die zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen, die mit dem Serum (1:100 verdünnt) der immunisierten Tiere gefärbt wurden.

Die Tests gegenüber Normalgewebe (Milz-, Nieren-, Bindege-
webs-, Hirnzellen) erfolgte auf ebenfalls mit aceton-
fixierten Kryostatschnitten mit der indirekten Immunperoxi-
dasefärbung.

Nur solche Klone, deren Antikörper mit den glialen Tumor-
zellen reagierten, aber fehlende bzw. herabgesetzte Reakti-
vität mit normalen Zellen und anderen Tumorzellen zeigten,
wurden weitergezüchtet. Zudem wurde die lichtmikroskopische
Darstellung von gliombindenden Antikörpern auf Kryostat-
schnitten von subkutanen Transplantationstumoren der Linie
79FR-G-41 durchgeführt. Die Antikörperbindung wurde mittels
indirekter Immunperoxidasefärbung nach folgendem Schema
(Sternberger, 1969) dargestellt:

- Schnitte 5 min in 100% Aceton fixieren und danach 3x10
min in PBS-A waschen
- Objektträger trocknen und 90 min mit 20% normalem
Schweineserum/PBS-A bei Raumtemperatur inkubieren
- Schweineserum vorsichtig mit saugfähigem Tuch absaugen
- Inkubation mit 1.Antikörper (serumfreier Hybridomkul-
turüberstand, 1:10 in PBS-A/5% FKS verdünnt)
- Schnitte 4x10 min in 1% normalen Schweineserum/PBS-A
waschen
- Inkubation mit 2.Antikörper (Meerrettichperoxidase-
konjugiertes Kaninchen-anti-Maus Ig), 1:100 in PBS-A/
5% FKS verdünnt
- Schnitte 4x10 min in 1% normalem Schweineserum/PBS-A
waschen
- Inkubation 20 min mit Amino-Äthyl-Carbazol-Substrat
(3 mg Amino-Äthyl-Carbazol in 1,2 ml Dimethylformamid
lösen, ad 30 ml mit 0,1 M Barbitalpuffer, pH 7,4
auffüllen und unmittelbar vor Gebrauch 12 µl 30% H₂O₂
zugaben

-Färben 2 min mit Meyer's Hämalaun (Merck)

-Gegenfärben 10 min unter fließendem Leitungswasser

-Objektträger abtropfen lassen und Kaiser's Glycerin-Gelatine (Merck) eindeckeln

-Deckglas am nächsten Tag mit Klarsichtlack verschließen
Auswertung und Dokumentation erfolgten mit einem inversen Kameramikroskop (Zeiss ICM 405, Oberkochen).

1.3.10 Gewinnung von serumfreien Hybridomüberständen

Die Hybridomzellen wurden auf 24-Linbroplatten (Nunc) in DMEM-Medium/20% FKS vermehrt und nachdem die Zellen die Löcher der Kultivierungsplatten größtenteils bedeckten auf 50 ml Plastikflaschen (Nunc) in serumfreies Hybridomerhaltungsmedium (FEB 100 Medium, Seromed, Berlin) umgesetzt. In diesem Medium überlebten die Zellen in der Regel zwei bis zu vier Wochen. Danach wurde das Medium aus den Flaschen entnommen, bei 800 g 10 min abzentrifugiert und bei 4° C unter Zusatz von 0,005% Thiomersal (Sigma) in sterilen Glasflaschen aufbewahrt.

1.3.11 Bestimmung von Immunglobulinsubklassen und -isotypen

Die Bestimmung wurde mittels der Agargel-Immunodiffusion nach Ouchterlony (1962) durchgeführt. Dazu wurden je 20 µl der zu bestimmenden, zehnfach konzentrierten Hybridomüberstände in das zentrale Loch einer Immunodiffusionsplatte (Miles Scientific, Naperville/USA) gegeben. Die peripheren Löcher wurden zweimal im Abstand von einer Stunde mit Kaninchen-anti-Maus-IG₁, -IG_{2a}, -IG_{2b}, -IG₃, -IGM, -IGa

(Miles, Yeda) gefüllt. Nach 48-stündiger Inkubation in einer feuchten Kammer waren Präzipitationslinien zwischen dem zentralen Loch und einem entsprechenden, mit Antiserum gefüllten, zu erkennen.

1.3.12 Hybridomkonservierung

Die Hybridomzellen der in 24-Linbroplatten kultivierten Klone wurden, nachdem sie die Löcher der Platten dicht bedeckten, aus den Platten entnommen, 10 min bei 800 g zentrifugiert und jeweils in Portionen von 1×10^6 Zellen in 1 ml Eingefriermedium, bestehend aus DMEM-Medium/50% FKS 10% DMSO nach einer Vorkühlung von 4 Stunden bei 4° C in sterilen Plastikkryo-Tubes (Nunc) bei -80° C tiefgefroren.

1.3.13 Verwendung weiterer monoklonaler Antikörper

Neben den durch die Fusion erzeugten monoklonalen Antikörpern wurden für die Untersuchungen noch weitere Antikörper verwendet. Die Hybridomklone 5CC3, 6EB4, 10BD3, 11EC7, 17EC5, 19FF2, 22FF1, 32DF5, 45HD2 entstammten Fusionen mit X63-Ag8.653 Myelomzellen und Milzzellen von mit Gliomzellen der Linie 77DG-G-166 und 83DG-G-422 immunisierten Mäusen. Bei immunochemischer Testung gegenüber normalen Hundezellen (Hirnzellen, Nierenzellen, Fibroblasten) zeigten sie, mit Ausnahme von geringer Reaktivität bei 17EC5, keine Reaktivität. Aufgrund von Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie, Colony Formation Inhibition Assay und zur antigenkörperabhängigen Zytotoxizität kann als gesichert gelten, daß diese Antikörper zellmembran-assoziierte Strukturen erkennen (Schmitt, 1986; Aumann, 1987).

Die Reaktivität der monoklonalen Antikörper und die perma-

nente Antigenexpression der Tumorzelllinien wurden in 14-tägigen Intervallen mittels indirekter Immunperoxidasefärbung überprüft.

1.4 Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern

Eine nähere Charakterisierung von intakten Antikörpern und Antikörperfragmenten erfolgte mit einer Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem linearen Porengradientengel bei reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen (nach Lämmli, 1970).

Mit der SDS-PAGE wurden in einer Elektrophoresekammer Proben unter Gleichschaltung der Nettoladungsdifferenzen in alleiniger Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht getrennt. Das SDS stellt ein bipolares Detergenz dar, das sich mit seinem hydrophoben Ende an entsprechende Seitenketten von Molekülen anlagert, während seine ionisierbaren Sulfatreste ins Lösungsmittel ragen. Dadurch kommt es zu einer Umhüllung der Moleküle mit einem stark negativen SDS-Mantel, der innermolekulare Ladungsunterschiede überlagert. Während der elektrophoretischen Trennung kommen somit nur noch die durch unterschiedliche Molekülgröße entstehenden Reibungswiderstände in Polyacrylamidgelen mit definierten Porengrößen zum Tragen, woraus eine Trennung der Moleküle nach unterschiedlichen Molekulargewichten resultiert. Dieser Molekularsiebeffekt des Porengradienten wirkt der Diffusion der Proben während der Trennung entgegen, so daß schärfere Banden entstehen und damit die Nachweisgrenze einzelner Fraktionen erhöht wird.

Durch Färbung der Gele wurden die Banden sichtbar gemacht und durch Vergleich mit einer Eichproteinlösung definierten Molekulargewichts das Molekulargewicht der Proben bestimmt.

Lösungen:

-Acrylamidlösung (40%)

Acrylamid, 2x krist. (Serva)	38,8 g
N,N'-Methylenbisacrylamid, 2x krist. (Serva)	1,2 g
Aqua dest	ad 100 ml

-Gelpuffer

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Merck)	18,2 g
Natrium-dodecyl-sulfat (SDS, Serva)	0,4 g
Natriumazid (Serva)	10 mg
in 80 ml Aqua dest lösen und mit 4N HCL auf ph 8,8 einstellen, dann auf 100 ml mit Aqua dest auffüllen	

-Laufpuffer

Tris	30,28 g
Glycin (Serva)	144,0 g
SDS	10 g
Natriumazid	10 mg
Aqua bidest	ad 1000 ml

-Probenpuffer

SDS	1 g
in 10 ml Gelpuffer lösen	
Aqua dest	ad 100 ml

Herstellung eines Polyacrylamidgels:

-Leichte Lösung (4%)

Acrylamidlösung	1,0 ml
Gelpuffer	2,5 ml
60% Glycerinlösung (Serva)	4,25 ml
Aqua dest	1,2 ml
Bromphenolblaulösung 0,01% (Merck)	1,0 ml

-Schwere Lösung (22,5%)

Acrylamidlösung	4,5 ml
Gelpuffer	2,0 ml
Aqua dest	1,5 ml

Den beiden Lösungen wurden jeweils 5 µl N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED, Serva) und 10 µl 40% Ammoniumpersulfatlösung (PER, Merck) zugegeben und in ein Gradientenmischgerät gefüllt. Dieses Gradientenmischgerät ermöglichte beim Entleeren eine lineare Mischung der beiden Lösungen in eine Gießkassette. Die Gießkassette bestand aus zwei Glasplatten (105x215 mm), die auf 0,4 mm Abstand gehalten wurden, einer Deckfolie mit aufgeklebten Probeslots und zusätzlich einer Trägerfolie (GelBond PAG Film, LKB, Bromma/Schweden), auf deren hydrophiler Seite das Gel polymerisierte. Zur chemischen Polymerisation, die durch PER und TEMED erfolgte, wurde die Gießkassette für 30 min bei 50° C in einen Trockenschrank gestellt, dann konnte die Trägerfolie mit dem aufpolymerisierten Gel aus der Gießkassette entnommen werden. Die Acrylamidkonzentration lag am unteren Rand bei 4%, am oberen Rand bei 22,5%. In die Probeslots wurden jeweils mit 1% Probepuffer 3 µg des mit Ammoniumsulfat präzipitierten und gegen PBS-A dialysierten monoklonalen Antikörpers einpipettiert (Jonak, 1980). Die

5 min im 100° C warmen Wasserbad inkubierten Proben wurden jeweils nicht reduziert bzw. zur Spaltung innermolekularer Disulfidbrücken in 5% 2-Mercaptoäthanol (Merck) reduziert. Die Elektrophorese wurde in der Elektrophoresekammer Multiphor 2117 (LKB) bei 60 mA max., 1000 V max. und 25 W max. während zwei Stunden durchgeführt. Das Volumen der Probelots betrug 5 µl, pro Gel konnten 12 Proben aufgetragen werden.

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel 15 min in 10% Trichloressigsäure (Merck) fixiert und mit Coomassie Brilliant Blau R 250 (Merck) und anschließend mit Silbernitrat (Merck) gefärbt.

-Coomassie-Blau-Färbung (nach Wilson, 1979)

15 min in 10% Trichloressigsäure fixieren

3 min in 25% Äthanol/10% Essigsäure waschen

30 min in 0,1% Coomassie-Blau in 40% Äthanol/10% Essigsäure färben

4x15 min in 25% Äthanol/10% Essigsäure entfärben

-Silberfärbung (nach Heukeshoven et al., 1983; Berson 1983)

2x5 min in 10% Äthanol waschen

3x3 min in Aqua dest waschen

30 min in 1% Silbernitratlösung geben

10 sec in Aqua dest

10 min in 3% NaCO₃/0,02% Formaldehyd entwickeln

10 min in 1% Essigsäure

3x3 min in Aqua dest

5 min in 250 ml Farmerschen Abschwächer (Tetenal, Norderstedt) baden

1 min in Leitungswasser waschen

5x3 min in Aqua dest

30 min in 0,1% Silbernitratlösung

10 sec in Aqua dest waschen

3-5 min in 3% NaCO₃/0,02% Formaldehyd entwickeln

10 min in 1% Essigsäure

3x3 min in Aqua dest waschen

1.5 Darstellung von GAA mit monoklonalen Antikörpern und Immunoblotting

1.5.1 Antigenpräparation von Tumorzellen

Die bei -80° C tiefgefrorenen Gliomzellen wurden im 37° C warmen Wasserbad innerhalb von 3 min aufgetaut, in ein steriles Zentrifugenglas übergeführt und dreimal bei 800 g 5 min lang in PBS-A/0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma) gewaschen. Die Membranpräparation wurde zweimal mit jeweils 2x10⁸ Zellen der Gliomzelllinien 79-FR-G-41,77DG-G-166, und 83DG-G-422 durchgeführt.

Die Tumorzellen wurden nach der Methode von Hall (1985) und Tobin (1987) durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Hierzu wurden die Zentrifugenröhrchen mit der Tumorzellsuspension dreimal in eine -20° C kalte 0,2 M CaCl₂-Lösung getaucht, eine Stunde bei -20° C belassen und im 37° C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Die Suspension wurde in einem Homogenisator PotterS (Braun, Melsungen) bei 1000 Umdrehungen/min homogenisiert und 10 min bei 1000 g zentrifugiert, um Zellkerne und unlysierte Zellen zu eliminieren. Der Überstand wurde abgenommen und das zurückbleibende Pellet von unlysierten Zellen erneut homogenisiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Überstände vereinigt und in einer Ultrazentrifuge L5.50 (Beckman, München) während 40 min bei 25 000 g zentrifugiert.

Das dabei erhaltene Pellet wurde in 2 ml Lyse-Reagenz aufgenommen. Das Lyse-Reagenz bestand aus 100 ml 10 mM Tris/HCL pH 7,8 mit 1 g SDS, 818 mg NaCl (Merck), 0,1 mM PMSF, 20,3 mg MgCl₂ (Merck) und 10 mg Natriumazid. Der Proteingehalt der Membranpräparation wurde auf einem Spektralphotometer MQ3 (Zeiss) durch Messung der Absorption bei 280 nm und der Nahrungsformel (A_{280}):1,4=(mg/ml) durchgeführt (Lemke et al., 1978). Der durchschnittliche Proteingehalt der Proben betrug 4,25 mg/10⁸ Zellen. Die Proben wurden in Portionen von 100 µl in Einfriertubes bei -20° C tiefgefroren.

1.5.2 Biochemische Behandlung der Membranpräparation

In Anlehnung an die Arbeit von Vennegoor et al. (1985) wurden die Proben mit Protease und Natrium-meta-perjodat behandelt, außerdem mit 2-Mercaptoäthanol wie unter 1.4 beschrieben. Die Membranpräparation wurde wie unter 1.5.1 durchgeführt, der Proteasehemmer PMSF allerdings nicht zugesetzt und die mit den Lyse-reagenz versetzte Membranpräparation in einem 0,1 M Tris/HCL-Puffer, pH 8,0 mit 10 mM CaCl₂ aufgenommen und 5 mg Protease (von Streptomyces griseus Typ XIV, Sigma) zugegeben. Die Behandlung der Proben mit SDS hat auf die Wirksamkeit der Protease keinen Einfluß (Andrews, 1986). Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37° wurde die Lösung 5 min im 100° C warmen Wasserbad inkubiert und danach auf das gleiche Volumen, wie die unter 1.5.1 behandelten Proben, auf einem Agitator CX (Millipore, Eschborn) mittels Membranfilter (Ausschlußgrenze 10 kd) konzentriert. Bei der Behandlung der Proben mit Natrium-meta-periodat wurde die mit dem Lyse-Reagenz versetzte Mem-

branpräparation in 0,1 M Natriumazetatlösung, pH 5,4 unter Zugabe von 50 mM Natrium-meta-perjodat aufgenommen und 18 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 20% Glycerin (Serva) in Natriumazetatpuffer, pH 7,0 gestoppt und wie oben beschrieben auf das Vergleichsvolumen der unbehandelten Proben konzentriert.

Die Behandlung mit Natrium-meta-perjodat führt durch Oxidation zu einer Spaltung zyklischer Zucker (Roberts et al., 1965), die Proteasebehandlung zu einer Auftrennung von Polypeptiden zu kleineren Untereinheiten und Aminosäuren. Durch Zugabe von 2-Mercaptoäthanol als Reduktionsmittel werden innermolekulare Cystein-Disulfidbrücken gespalten.

1.5.3 SDS-PAGE

Die Membranpräparationen wurden mittels einer SDS-PAGE in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde, ähnlich wie unter 1.4 beschrieben, mit folgenden Modifikationen durchgeführt.

Die Dimension des Gels war 110x160 mm, die Dicke 1,2 mm, der Konzentrationsgradient reichte von 4-15%. Daraus folgend ändert sich die quantitative Zusammensetzung von leichter und schwerer Acrylamidlösung wie folgt:

	4%	15%
Acrylamid 40%	1,2 ml	3,3 ml
Puffer	3,0 ml	2,75 ml
Glycerin	5,0 ml	---
Aqua dest	2,8 ml	2,75 ml
	12,0 ml	8,8 ml

Diese Lösungen wurden im Gradientenmischgerät gemischt und in die Gießkassette gefüllt, das Gel wurde im Unterschied

zu 1.4 auf die hydrophobe Seite des Gelbond-Films aufgebracht. Das Volumen der Probeslots war 100 µl, pro Gel konnten 8 Proben aufgetragen werden.

Als Molekulargewichtstandard (Sigma) wurde eine Mischung von sieben Proteinen verwendet, die mit einem nicht näher definierten blauen Farbstoff konjugiert (Betriebsgeheimnis, Sigma) und somit vorgefärbt waren. Im einzelnen handelt es sich dabei um:

Triosephosphatisomerase	26,6 kd
Laktatdehydrogenase	36,5 kd
Fumarase	48,5 kd
Pyruvatkinase	58 kd
Fruktose-6-Phosphatkinase	84 kd
Galaktosidase	116 kd
Makroglobulin	180 kd

Von den mit Lyse-Reagenz (s. 1.5.1) versetzten Proben wurden jeweils 50 µl im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer versetzt und 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich unter Zugabe von 5% Mercaptoäthanol verdünnt. Nach Abkühlung der Proben wurden pro Probeslot jeweils 100 µl aufgetragen, die Elektrophorese gestartet und nach 90 min, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hatte, beendet.

1.5.4 Immunoblotting

Das Immunoblotting wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Towbin et al., (1979) und Kyhse-Anderson (1985) durchgeführt. Unter Blotting versteht man den Transfer von Makromolekülen auf eine immobilisierende Membran nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Gel. Dabei bleibt das Bandenmuster erhalten. Bei Verwendung von Nitrozellulosemembranen (NC-Membranen) wird diese Technik als Western-Blotting bezeichnet. Auf einer Nitrozellulosemembran werden die Moleküle über hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken (Handman et al., 1985) auf der Membran gebunden. Eine Fixierung, die die biologische Funktion der transferierten Proben beeinträchtigen könnte, ist nicht notwendig.

Bei der Elution der Proben aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran wird das SDS von den Molekülen abgetrennt und die Moleküle adsorbieren an die Membran, wobei das SDS weiter zur Anode wandert (Towbin et al., 1984). Durch immunochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die meisten Moleküle dabei ihre native Konfiguration nicht verändern (Anderson, 1982; Goding, 1983).

Das Blotting wurde auf einem Semi-dry Elektrobloetter (Sartorius, Göttingen) durchgeführt. Nach der Spülung der Graphit-Elektroden mit destilliertem Wasser wurde vier Lagen Filterpapier (Whatmann 3; Schleicher und Schoell, Dassel) in Anodenpuffer 1 getränkt (0,3 M Tris in 20% Methanol) und auf die Graphitanode gelegt. Danach folgten zwei Lagen Filterpapier, getränkt in Anodenpuffer 2 (25 mM Tris in 20% Methanol), und darauf die in Aqua dest getränkte Nitrozellulosemembran (0,45 um Dicke, BA 85 Membranfilter, Schleicher und Schoell). Auf die Nitrozellulosemembran wurde das Polyacrylamidgel von der Plastikträgerfolie abgerollt, auf

das Gel wiederum wurden vier in Kathodenpuffer getränkte Lagen Filterpapier gelegt. Der Kathodenpuffer bestand aus 25 mM Tris in 20% Methanol und 40 mM Aminocaprinsäure (Merck). Die mit Aqua dest gespülte Kathode wurde dann auf den Stapel gelegt und der Transfer bei 150 mA während zwei Stunden durchgeführt, danach wurde die Nitrozellulosemembran nach der Markierung der Auftragsstellen der Proben entnommen und für 30 min in 4% Magermilchpulverlösung/PBS-A (Glücksklee, Hamburg) geschüttelt. Die Magermilchpulverlösung sättigt alle unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran ab und verhindert so eine unspezifische Antikörperbindung (Johnson, 1984).

1.5.5 Immunochemischer Nachweis von GAA

Nach der Behandlung der NC-Membranen mit Magermilchpulverlösung wurden die Membranen nach folgenden Schemata gefärbt:

1. Färbung mit dem Substrat nach Nexo (nach Towbin et al., 1984)

- 1 min in Tris gepufferter Saline, pH 7,4 (TBS)
- Inkubation in einer feuchten Kammer mit MAK in FEB, verdünnt 1:10 PBS-A/0,05% Tween 20 (1.Antikörper)
- 3x5 min in PBS-A/Tween waschen
- Inkubation mit dem 2.Antikörper, 1:50 im PBS-A/Tween verdünnter Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus Ig
- 3x5 min in PBS-A/Tween waschen
- 1 min in 50 mM Azetatpuffer pH 5,0 waschen
- Färbung mit 20 mg 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol in 5 ml Dimethylformamid gelöst, mit 95 ml Azetatpuffer,

pH 5,0 verdünnt, filtriert und unmittelbar mit 50 μ l 30% H_2O_2 -Lösung versetzt

Nach 10 min wurde die Membran aus der Färbelösung genommen und mehrmals mit Aqua bidest gespült. Die Membranen werden zwischen Filterpapier getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt

2. Immunogold-Silberfärbung (nach Daneels et al., 1986)

-3x5 min waschen in 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,2 mit 0,1% bovinem Serumalbumin (Sigma), 0,9% NaCl, 20mM Natriumazid

-2 Stunden inkubieren mit 1.Antikörper, MAK in FEB, 1:10 in PBS-A/0,05% Tween, pH 7,4, verdünnt

-3x5 min in 20 mM Tris/HCl-Puffer waschen

-2 Stunden inkubieren mit 2.Antikörper, Gold-markierter-Ziege-anti-Maus-Ig (Janssen,Beerse/Belgien) 1:100 verdünnt in Tris/HCl-Puffer unter Zusatz von 0,5% Gelatine

-2x5 min in Tris/HCl-Puffer waschen

-1 min in Aqua bidest waschen

-10-20 min in Silberverstärker-Lösung (Intens ET II, Janssen) baden

-mehrmals mit Aqua bidest waschen

Die Membranen wurden zwischen Filterpapier getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

1.5.6 Molekulargewichtsbestimmung

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde zu jedem Gel mit Hilfe der Markerproteine eine Eichgerade auf halblogarithmischem Papier aufgestellt. Dazu wurden die Längen der Wanderungstrecken der einzelnen Banden der Eichproteine ab Gelanfang gemessen und auf der Abszisse aufgetragen.

Die Molekulargewichte der Eichproteine wurden auf der Ordinate markiert und die so erhaltenen Punkte zu einer Gerade verbunden. Die Bestimmung der Molekulargewichte der markierten Substanzen erfolgte durch Ausmessen ihrer Wanderungstrecken und das korrespondierende Molekulargewicht konnte mittels der Eichgerade gefunden werden.

1.6 Immunoaffinitätschromatographie

Als weiterer Nachweis für GAA wurde eine Immunoaffinitätschromatographie in Anlehnung an Rathjen (1982) durchgeführt. Bei dieser Technik befindet sich der MAK stationär in einer Säule und solubilisiertes GAA wird über die Säule gegeben. Nach einer spezifischen Bindung MAK/GAA wird diese durch Änderung des pH-Wertes gelöst und das GAA ist isoliert darstellbar.

1.6.1 Antigenpräparation

Die Tumorzellen der Linien 77DG-G-166 und 83DG-G-422 wurden mit Nonidet P-40 (N P-40, Sigma) lysiert. Dieses Detergenz lysiert Plasma- und Zellmembranen, läßt aber die Zellkernmembran intakt. Proteinstrukturen werden bei dieser Membranpräparation nicht denaturiert, der Einfluß auf Antigen-Antikörperinteraktionen bleibt somit gering.

Die Antigenpräparation wurde auf folgende Weise durchgeführt (modifiziert nach Parish et al., 1980):

- 10⁸ Zellen innerhalb von drei Minuten im 37° C warmen Wasserbad auftauen, in steriles Zentrifugenglas überführen und dreimal in PBS waschen
- Zellen in eisgekühlter 0,5% N P-40/PBS-A-Lösung 30 min rühren, der Lösung sind zusätzlich 5 mM PMSF als Proteasehemmer beigesetzt
- 20 min mit 1000 g zentrifugieren, um die Zellkerne zu pelletieren
- 30 min mit 100 000 g zentrifugieren, um größere Zellpartikel abzutrennen

Die im Überstand verbleibende Antigene werden als lösliche Antigene (LA) bezeichnet (Kahan, 1971).

1.6.2 Isolierung von GAA

Nach der Antigenpräparation befinden sich im Überstand neben GAA verschiedenste Zellmembran- und Plasmaantigene. Die GAA können durch eine Immunoaffinitätschromatographie abgetrennt werden. Bei diesem Verfahren wurden die MAK 6EB4, 17EC5, 32DF5, 45HD2 an eine Matrix, einen N-hydroxy-succinimidester (Affi-gel 10, Biorad, München) gekoppelt, welcher hochsensitiv an freie Aminogruppen bindet. Diese Matrix mit den gebundenen MAK wurde in eine mit Filter versehene Säule (Econosäule, Volumen 8 ml, Porendurchmesser des Filters 35 µm, Biorad) gegeben, über die die LA geleitet wurden. Die Bindung der MAK an die Gelmatrix wurde so vorgenommen:

1 ml Gelmatrix wurde in einer Mikrofilternutsche (Volumen 2 ml, Porendurchmesser des Filters 10-40 µm, Bender und Hobein, München) dreimal mit Aqua bidest gewaschen. Anschließend wurden die mit Ammoniumsulfat präzipitierten und über Protein-A gereinigten MAK (Ey et al., 1978) mit der Gelmatrix vermischt (4 mg MAK pro ml Gelmatrix). Die Kopplung erfolgte in 0,1 M NaCO₃, pH 8,0 bei 4° C über einen Zeitraum von 4 Stunden. Freie Bindungsstellen der Gelmatrix wurden mit 1 M Äthanolamin/HCl-Lösung, pH 8,0 (Sigma) abgesättigt. Die Dauer des Blockierungsvorgangs betrug 60 Minuten. Gelmatrix und gekoppelter MAK wurden in eine Econosäule (S2) gegeben und solange mit 0,1 M NaHCO₃ gewaschen, bis das Eluat proteinfrei war (Überprüfung auf einem Spektralphotometer MQ3 bei 280 nm).

Zur Reduzierung unspezifischer Proteinbindungen wurden die LA zunächst über eine Säule (S1) geleitet, die an Affi-gel gekoppelte Mäuseserumproteine enthielt. Das Mäuseserum wurde vor der Kopplung abzentrifugiert und 30 min bei 56° C

inaktiviert, dann mit Ammoniumsulfat präzipitiert und gegen PBS-A 48 Stunden dialysiert. Pro ml Gelmatrix wurden 8 mg Protein gekoppelt.

S1 und S2 wurden miteinander verbunden und die LA bei einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 6ml/h über die Säulen geleitet. Mit 250 ml des Solubilisierungspuffers wurde die Säule S2 gewaschen, um unspezifisch gebundene LA zu eluieren. Die Elution von gebundenem GAA erfolgte mit 2 ml 0,1 M Diäthylamin, pH 11,5 (Sigma), das Eluat wurde mit 0,2 ml 1 M Tris/HCl-Puffer, pH 6,0 (Ross, 1982) neutralisiert, und mit ^{125}Jod (^{125}J) radioaktiv markiert (Nurminen et al., 1985). Bei der radioaktiven Markierung kommt es zur Bildung von Na^{125}J , das in die Aminosäure Tyrosin inkorporiert wird. ^{125}J dient zur selektiven Markierung von Proteinen.

Nach Spülung von S2 mit dem Solubilisierungspuffer wurde die Affinitätschromatographie mit dem radioaktiv markierten Eluat wiederholt. Bei der erneuten Elution wurde in Portionen von 50 μl fraktioniert und deren Gehalt an Radioaktivität in einem Isotopen-Kalibrator (Berthold, Wildbad) bestimmt. Der höchste Wert einer Fraktion lag bei der Affinitätschromatographie mit dem MAK 6EB4 bei 48,3 uCurie (uCi), bei der Affinitätschromatographie mit dem MAK 17EC5 bei 21,3 uCi. Mit den MAK 32DF5 und 45HD2 konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden - wie unter 1.4 beschrieben - mit Probenpuffer versetzt und in einer SDS-PAGE analysiert. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Gel durch Abscannen im Maßstab 1:1 mit einem Dünnschichtscanner LB 2722 (Berthold) analysiert. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Vergleich mit Standardproteinen im Molekulargewichtsbereich von 14-94 kd (Pharmacia, Uppsala/Schweden).

2. Ergebnisse

2.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Zellkulturen

Die Zellkulturen der Gliomlinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41 waren während des gesamten Untersuchungszeitraums bezüglich Morphologie, Expression gliaspezifischer Proteine und Wachstumsgeschwindigkeit stabil.

Die Zellkultur des Hundeglioms 77DG-G-166 bestand aus kleinen bis mittelgroßen schlanken, spindelförmigen Zellen mit zentral gelegenen rundlichen Kernen. Die Zellen bildeten lange schmale Zellfortsätze aus, die sich peripher im Spitzenbereich nochmals fein verzweigten. Bei der Zellkultur 83DG-G-422 war das morphologische Bild von heterogenen Zellformen geprägt. Plumpere Zellen mit kurzen, sich verzweigenden Ausläufern waren neben spindelförmigen, schlanken Zellen zu finden. Die rundlichen bis ovalen Kerne lagen zentral. Die Zellen der Linie 79FR-G-41 zeigten das typische Bild von pleomorphen Astrozytomzellen. Die protoplasmareichen Zellen mit zentral gelegenen Kern bildeten lange Zellfortsätze aus. Bei den schlanken Zellen waren häufig Mitosefiguren und Riesenzellbildung zu finden.

2.2 Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Bei insgesamt 5 Fusionen konnten 4 Hybridomklone gewonnen werden, die nach dreimaliger Klonierung ihre Antikörperproduktion gegenüber ihren Zielzellen, der Linie 79FR-G-41, gleichbleibend beibehielten. Bei vergleichender Darstellung der Bindungsreaktionen mittels indirekter Immunperoxidasefärbung auf fixierten und unfixierten Zellen waren kei-

ne quantitativen oder qualitativen Unterschiede festzustellen. Von diesem 4 Hybridomklonen reagierten zwei (2-41-A, 2-41-B) mit normalem Rattengewebe, zwei Hybridomklone (1-41-A, 1-41-C) erkannten hingegen normales Rattengewebe (Hirnzellen, Fibroblasten, Nierenzellen und Milzzellen) nicht.

Tab.2: Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit Gliomzellen der Linie 79FR-G-41 und normalen Rattenzellen (Hirnzellen, Fibroblasten, Nierenzellen und Milzzellen); indirekte Immunperoxidasefärbung auf aceton-fixierten Krostatschnitten.

Klon	79FR-G-41	Hirn- zellen	Fibro- blasten	Nieren- zellen	Milz- zellen
1-41-C	+++	-	-	-	-
1-41-A	+++	-	-	-	-
2-41-A	+++	++	+	++	+
2-41-B	+++	++	+	+	+

Die Hybridomklone 1-41-A, 1-41-C wurden im 14-tägigen Abstand kloniert um nicht produzierende Varianten zu eliminieren und standen für immunochemische Färbungen zur Verfügung. Die Klone 2-41-A und 2-41-B waren aufgrund ihrer Reaktivität mit normalen Rattengewebe zum Nachweis von GAA nicht geeignet. Weiterhin standen zum Nachweis von GAA bei den Tumortalinien 77DG-G-166 und 83DG-G-422 folgende Klone mit stabiler Antikörperproduktion zur Verfügung, die, wie die Klone 5CC3, 6EB4, 10BD3, 11EC7, 19FF2, 22FF1, 32DF5 und 45HD2 mit Normalgewebe nicht reagierten oder wie der Klon 17EC5 nur sehr geringgradige Reaktivität mit Normalgewebe zeigte. Die permanente Expression von GAA konnte durch Färbung mit den MAK in 14-tägigen Intervallen über den Zeitraum eines Jahres festgestellt werden. Dies entspricht über 100 in-vitro-Kultivationen.

2.2.1 Kreuzreaktionen mit neuroektodermalen Tumorzellen verschiedener Spezies

Die MAK wurden mit der Immunperoxidasefärbung gegen verschiedene Tumorzelllinien neuroektodermalen Ursprungs getestet. Bei den Tumorzelllinien handelt es sich um Glioblastome der Ratte (F98 und RG2), Melanome von Maus (B16) und Minipig (E251, 85MP-M-198), humane Astrozytome (N-63, N-66) und Glioblastome (N-59, N-64).

Tab.3: Kreuzreaktion der einzelnen MAK mit verschiedenen Tumorzelllinien, indirekte Immunperoxidasefärbung, Bewertung: +++ starke, ++ mittelstarke, + schwache, - keine Reaktion.

Zelllinie	1-41-A	1-41-C	5CC3	6EB4	10B03	11EC7	17EC5	19FF2	22FF1	32DF5	45H02
79FR-G-41	+++	+++	++	++	+	++	++	-	-	-	-
77DG-G-166	-	-	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	++
83DG-G-422	+	-	+	+	+	+	+++	+++	++	++	+++
RG2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F98	+	+	-	-	-	-	-	++	++	-	++
B-16	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
85MP-M-198	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
E251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-59	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-63	-	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-
N-64	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+
N-66	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+	-

Es zeigte sich ein kreuzreaktives Färbeverhalten der MAK zwischen den Hunde- und Rattengliomlinien, Melanome und menschliche Zellen wurden nur vereinzelt erkannt. Weiterhin ist festzustellen, daß die MAK (mit Ausnahme von 17EC5) gegen TAA der Klasse 2 (Einteilung nach Old, 1981) gerichtet sind, diese TAA also auf autologen Tumorzellen und auf Zellen einiger allogener Tumoren vorkommen. Der MAK 17EC5 ist gegen TAA der Klasse 3 gerichtet, sie finden sich auf verschiedenen normalen und malignen Zellen.

2.2.2 Bestimmung von Immunglobulinsubklassen und -isotypen

Im Agargel-Immundiffusionstest wurden zehnfach konzentrierte serumfreie Kulturüberstände gegen Subklassen- und Isotypenantisera von Kaninchen (Miles) getestet. Hierbei wurden aufgrund der Präzipitationslinien 9 MAK als IgG und 2 MAK als IgM klassifiziert.

Tab.4: Immunglobulinklassenbestimmung von 11 MAK mittels Agargel-Immundiffusionstest nach Ouchterlony (1962)

Klon	1-41-A	IgG ₁	Klon	17EC5	IgG _{2b}
Klon	1-41-C	IgG _{2a}	Klon	19FF2	IgG ₁
Klon	5CC3	IgG _{2b}	Klon	22FF1	IgG ₁
Klon	6EB4	IgG _{2b}	Klon	32DF5	IgM
Klon	10BD3	IgG ₁	Klon	45HD2	IgM
Klon	11EC7	IgG _{2b}			

2.3 Transplantationstumoren

Nach subkutaner Injektion von 5×10^6 Tumorzellen der Linie 79FR-G-41 kam es nach 14 Tagen zur Ausbildung von haselnuß-großen Tumoren im Bereich der Injektionsstelle. Sie wurden nach Euthanasie der Trägartiere entnommen. Die Tumoren waren gut gegen das umgebende Gewebe abgegrenzt, weißlich und wiesen wenige petechiale Blutungen an der Oberfläche auf. Histologisch zeigte der Tumor reiche kapilläre Vaskularisation, Riesenzellbildung und punktförmige Nekrosen. Die Tumorzellen bildeten über große Areale ein grobmaschiges Netzwerk, wobei die Zellen hinsichtlich des morphologischen Erscheinungsbildes mit den primären Kulturen übereinstimmten. Bei der immunhistologischen Färbung mit den MAK 1-41-C und 1-41-A wurden die Zellen homogen angefärbt.

2.4 Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern und deren Fragmenten

Mit der SDS-PAGE konnten bei Maus-IgG-Antikörpern verschiedener Subklassen außer kompletten IgG-Molekülen folgende Fragmente dargestellt werden:

1. nicht reduzierte Proben

F(ab)₂-Fragmente bei IgG₁ und IgG_{2a}

Fab/c-Fragmente bei IgG_{2b}

schwere Ketten bei allen IgG, bei IgG₁ und IgG_{2a}

als einzelne Bande, bei IgG_{2b} als doppelte Banden

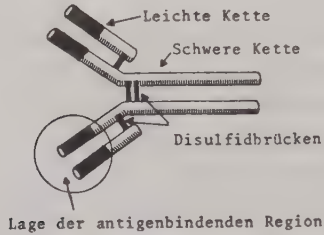
leichte Ketten bei allen IgG als einzelne Banden

2. reduzierte Proben

Fc-Fragmente bei IgG₁ und IgG_{2a}

schwere und leichte Ketten bei allen IgG

Abb.2: Einfaches Modell eines IgG-Moleküls (Tizard, 1981)



Durch Vergleich mit Standardproteinen von 26-180 kd konnte nachgewiesen werden, daß sich IgG₁ und IgG_{2a} symmetrisch in F(ab)₂ - und kleinere Fragmente, IgG_{2b} zum Unterschied asymmetrisch in Fab/c- und kleinere Fragmente aufspalten. Die F(ab)₂-fragmente waren geringgradig schwerer als die Fab/c-fragmente und wanderten deshalb im Polyacrylamidgel etwas langsamer und weniger weit als Fab/c-fragmente. Die schweren Ketten der verschiedenen IgG stellten sich unterschiedlich dar, bei IgG₁ und IgG_{2a} als einzelne, bei IgG_{2b} als doppelte Banden. Komplette IgG-Moleküle waren nur bei den nicht reduzierten Proben nachweisbar, leichte Ketten bei allen reduzierten und nicht reduzierten IgG. Fc-Fragmente waren bei reduzierten IgG₁ und IgG_{2a} darstellbar. Bei einer Bande (X, siehe Abb.4) von nicht reduzierten IgG₁-Molekülen war keine Zuordnung zu definierten Antikörperfragmenten möglich, deren Molekulargewicht lag zwischen dem von F(ab)₂ und Fab/c-Fragmenten.

Bei den Maus-IgG-Antikörpern handelte es sich um monoklonale Antikörper, die mit Ammoniumsulfat präzipitiert wurden und über eine Protein-A-Säule gereinigt wurden. Die Subklassenbestimmung erfolgte mit dem Verfahren nach Ouchterlony (s. 1.3.11).

Abb.3: Schematische Darstellung zur Fragmentation von Maus-IgG-Antikörpern in $F(ab)_2$ -, Fab/c-Bruchstücke und kleinere Bruchstücke in Abhängigkeit ihrer Subklassenzugehörigkeit, die Pfeile kennzeichnen die Bruchstellen (Parham, 1983)

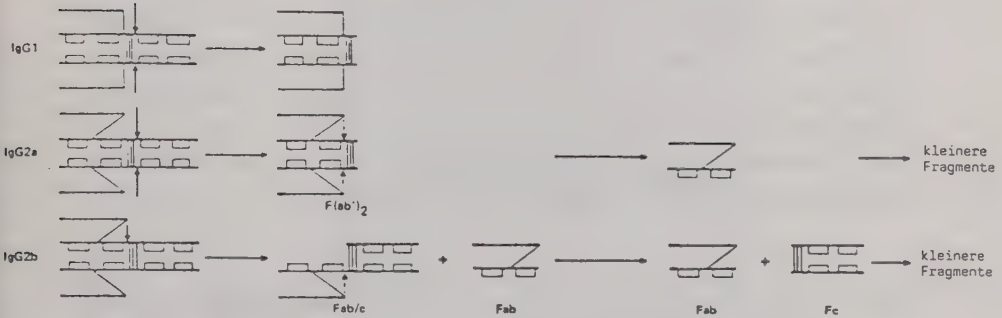
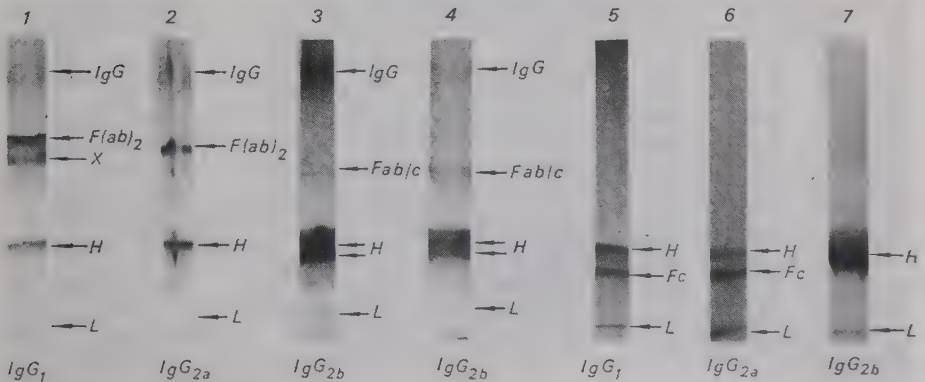


Abb.4: Darstellung von kompletten Maus-IgG-Antikörpern verschiedener Subklassen und deren Fragmenten (L: light chain, leichte Kette; H: heavy chain, schwere Kette; Fc-, Fab/c-, X-, $F(ab)_2$ -Fragment) in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung. Die Proben 1-4 wurden in 1% SDS-Probenpuffer, die Proben 5-7 in 1% SDS-Probenpuffer unter Zusatz von 5% Mercaptoäthanol gelöst. Die Feststellung des Molekulargewichts erfolgte durch Vergleich mit Standardproteinen von 26-180 kD



2.5 Ergebnisse zum Nachweis von GAA mittels SDS-PAGE und Immunoblotting

Zur Detektion von GAA wurden die Nitrozellulosemembranen mit den monoklonalen Antikörpern inkubiert und Bindungsreaktionen immunochemisch durch Enzym-Substrat-Reaktion mit Amino-Äthyl-Carbazol-Färbung (AEC-Färbung) und Immunogold-Silber-Färbung (IGS-Färbung) sichtbar gemacht. Dabei konnten folgende Banden durch Vergleich mit den Molekulargewichtsstandards dargestellt werden (Tab.5; Abb.5,6)

Tab.5: Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA anhand immunochemischer Markierung mittels MAK bei den Gliomlinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41
AEC: Amino-Äthyl-Carbazol-Färbung, IGS: Immunogold-Silberfärbung. Als Vergleichswerte dienten Standardproteine von 26-180 kd

Gliomlinie	MAK	Molekulargewicht des markierten GAA in kd	angewandte Färbung
77DG-G-166	5CC3	95 kd	AEC + IGS
77DG-G-166	6EB4	--	AEC + IGS
77DG-G-166	10BD3	40 kd	AEC + IGS
77DG-G-166	10BD3	83 kd	AEC + IGS
77DG-G-166	11EC7	75 kd	IGS
77DG-G-166	11EC7	105 kd	AEC + IGS
77DG-G-166	11EC7	157 kd	AEC + IGS
77DG-G-166	22FF1	75 kd	IGS
77DG-G-166	22FF1	105 kd	AEC + IGS
77DG-G-166	22FF1	157 kd	AEC + IGS
83DG-G-422	17EC5	--	AEC + IGS
83DG-G-422	32DF5	--	AEC + IGS
83DG-G-422	45HD2	--	AEC + IGS
79FR-G-41	1-41-A	54 kd	IGS
79FR-G-41	1-41-A	110 kd	IGS
79FR-G-41	1-41-C	42 kd	IGS

Abb.5: Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA bei der Gliomlinie 770G-G-166 mittels Western-blotting und immunochemischer Färbung (A: Färbung mit Amino-Äthyl-Carbazol; J: Immunogold-Silberfärbung) mit den monoklonalen Antikörpern SCC3, 10BD3, 11EC7, 22FF1. Die Maßeinheit ist kilodalton (kd). Als Vergleichswert dienten Molekulargewichtsstandards (St) von 26-180 kd

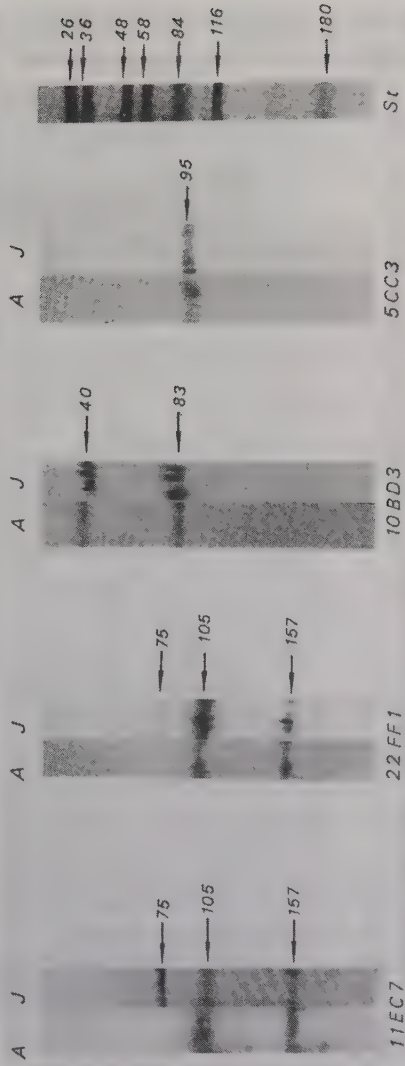


Abb.6: Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von GAA mit den monoklonalen Antikörpern 1-41-C und 1-41-A bei der Gliomlinie 79FR-G-41 und mit dem monoklonalen Antikörper 19FF2 bei der Gliomlinie 83DG-G-422. Als Nachweistestechniken wurden Western-blotting und immunochemische Färbungen (A: Färbung mit Amino-Äthyl-Carbazol; J: Immunogold-Silberfärbung) angewendet. Die Maßeinheit ist kilodalton (kd). Als Vergleichswert dienten Molekulargewichtsstandards (St) von 26-180 kd

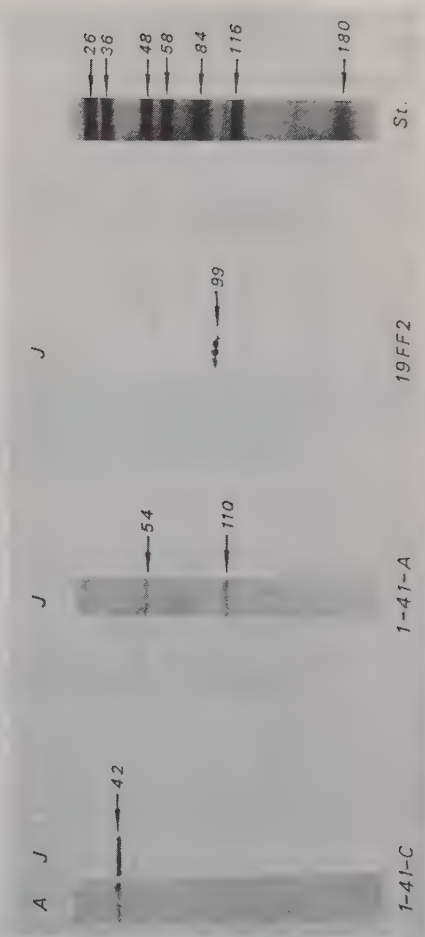
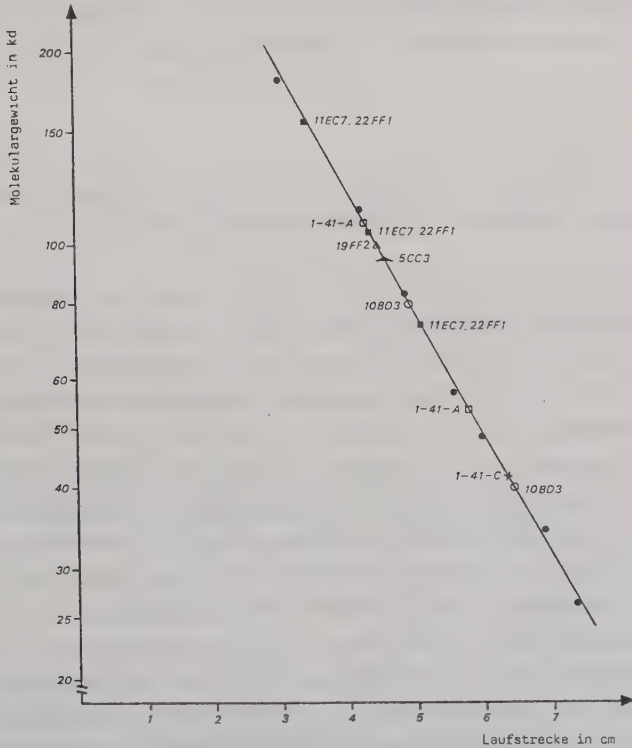


Abb.7: Eichgerade mit der Darstellung der Laufstreckenlänge von Standardproteinen und GAA, die durch Färbung mit monoklonalen Antikörpern markiert wurden und mit deren Bezeichnung gekennzeichnet wurden



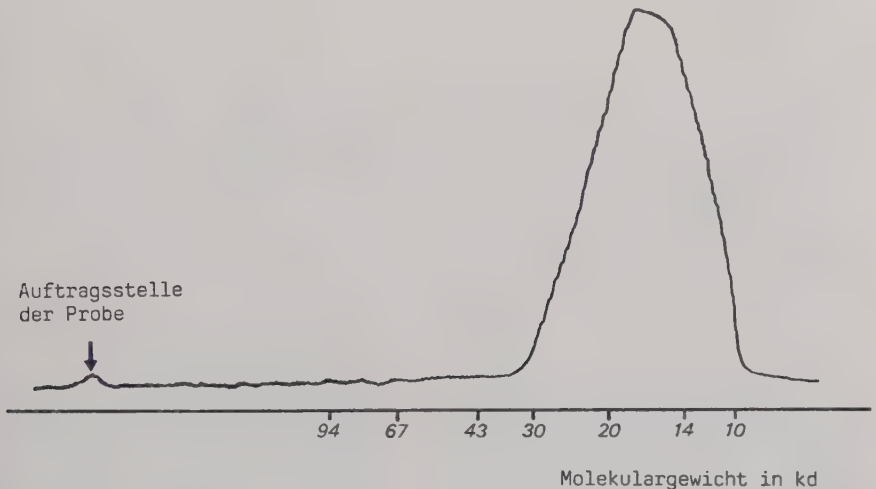
•-Standardproteine:	Triosephosphatisomerase	26,6 kd
	Laktatdehydrogenase	36,5 kd
	Fumarase	48,5 kd
	Pyruvatkinase	58 kd
	Fruktose-6-Phosphatkinase	84 kd
	Galaktosidase	116 kd
	Makroglobulin	180 kd

Von den mit der IGS-Färbung darstellbaren Banden konnte ein Großteil auch mit der AEC-Färbung markiert werden, zum Teil waren die Banden aber nur mit der IGS-Färbung darstellbar, was auf eine höhere Sensitivität dieser Färbereaktion hindeutet. Vier monoklonalen Antikörpern konnten bei diesen Färbungen keine korrespondierenden Antigene zugeordnet werden.

2.6 Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung von TAA mittels Immunoaffinitätschromatographie und SDS-PAGE

Mit den vier Antikörpern 6EB4, 17EC5, 32DF5 und 45HD2 wurde eine Immunoaffinitätschromatographie durchgeführt. Nachdem die radioaktiv markierten Proben aus der Affinitätschromatographie auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen wurden, wurde nach Beendigung der Elektrophorese die radioaktive Verteilung gemessen und im Maßstab 1:1 mit einem Schreiber graphisch dargestellt. Nur in zwei Fällen konnten positive Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der Akkumulation von Radioaktivität konnte dem MAK 6EB4 GAA innerhalb des Molekulargewichtsbereich von 10-30 kd bei der Zelllinie 77DG-G-166 zugeordnet werden und, wenngleich quantitativ geringer, dem MAK 17EC5 GAA im Bereich von 25-55 kd bei der Zelllinie 83DG-G-422. Bei den GAA handelt es sich um Proteinstrukturen, da sie sich mit 125 Jod radioaktiv markieren ließen. Mit den MAK 32DF5 und 45HD2 konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden, nach Auswertung der Radioaktivitätsverteilung im Polyacrylamidgel waren keine signifikanten Akkumulationen festzustellen.

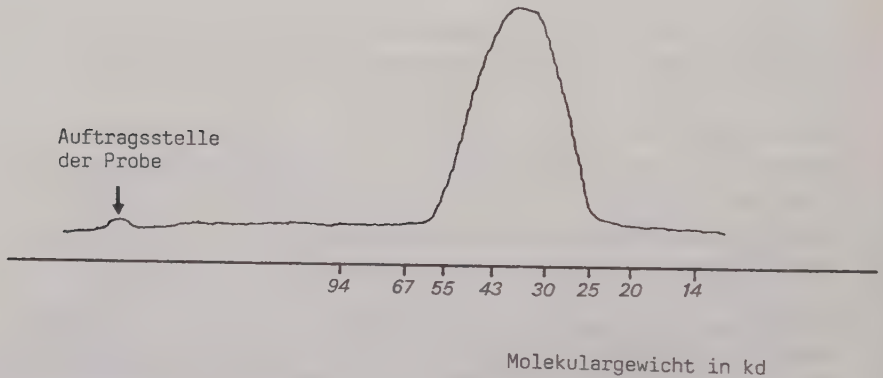
Abb.8: Radioaktivitätsverteilung von 125 Jod-markierten GAA im Polyacrylamidgel nach Affinitätschromatographie mit dem MAK 6EB4 und der Membranpräparation der Tumorzelllinie 77DG-G-166. Die markierten GAA liegen im Bereich von 10-30 kd, als Vergleichswert dienen Molekulargewichtsstandards von 14-94 kd



-Standards:	Laktalbumin	14 kd
	Trypsininhibitor	20 kd
	Carboanhydrase	30 kd
	Ovalbumin	43 kd
	Albumin	67 kd
	Phorpyrylase	94 kd

Der Wert von 10 kd wurde aus einer Eichgerade entnommen, die anhand der Wanderungsstrecken der Standardproteine erstellt wurde.

Abb.9: Radioaktivitätsverteilung von ^{125}Jod -markierten GAA im Polyacrylamidgel nach Affinitätschromatographie mit dem MAK 17EC5 und der Membranpräparation der Tumorzelllinie 83DG-G-422. Die markierten GAA liegen im Bereich von 25-55 kd, als Vergleichswert dienten Molekulargewichtsstandards von 14-94 kd



-Standards:	Laktalbumin	14 kd
	Trypsininhibitor	20 kd
	Carboanhydrase	30 kd
	Ovalbumin	43 kd
	Albumin	67 kd
	Phosphorylase	94 kd

Die Werte 25 kd und 55 kd wurden aus einer Eichgerade entnommen, die anhand der Wanderungsstrecken der Standardproteine erstellt wurde.

2.7 Stoffklassenbestimmung

Nach der Behandlung der GAA mit Protease, Natrium-meta-perjodat und mit Mercaptoäthanol war, im Gegensatz zu biochemisch unbehandelten GAA, keine Antikörperbindung mehr feststellbar. Es ist daher zu folgern, daß es sich bei allen mittels Immunoblottechnik darstellbaren GAA um Glykoproteine handelt, die über innermolekulare Disulfidbrücken verfügen.

Das zur radioimmunologischen Darstellung von GAA verwendete ^{125}Jod diente zugleich zum Proteinnachweis, da es in Aminosäuren inkorporiert wird (neben Histidin und Tryptophan hauptsächlich in Tyrosin, Nurminen et al., 1985).

Abb. 10:

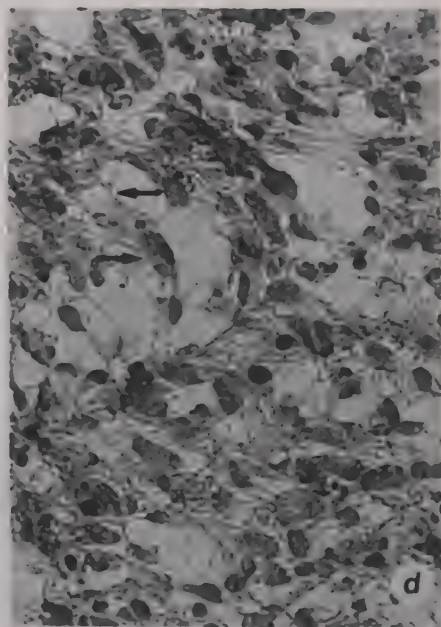
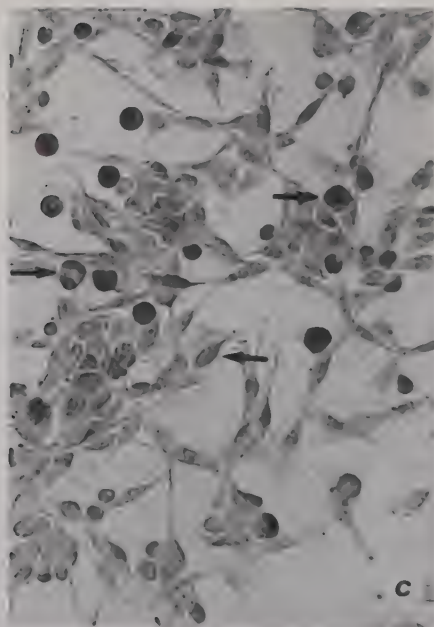
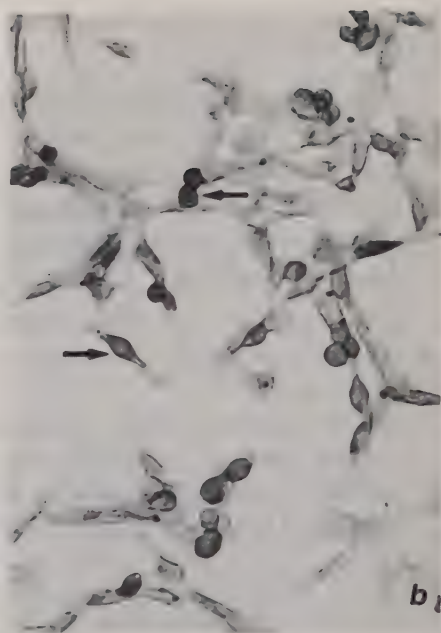
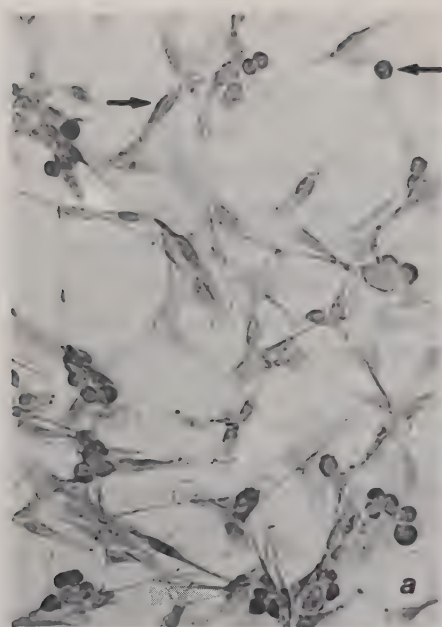


Abb.10: Immunperoxidasefärbung mittels MAK auf Zellen der Gliomlinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41

- a: Zellkultur 77DG-G-166, 80. Passage; schlanke, spindelförmige Zellen mit langen schmalen Zellfortsätzen, der MAK 6EB4 färbt die Zellmembran an (→), besonders deutlich bei abgekugelten Zellen (←), x 400

- b: Zellkultur 83DG-G-422, 73. Passage; der MAK 19FF2 binden an die Zellmembran von spindelförmigen (→) und mitotischen Zellen (←), x 400

- c: Zellkultur 79FR-G-41, 86. Passage; zahlreiche Mitosen (→), der MAK 1-41-A färbt die Zellen homogen an (←), Gegenfärbung mit Hämalaun, x 400

- d: Transplantationstumor von 79FR-G-41, die Zellen bilden ein grobmaschiges Netzwerk mit feinen Zellfortsätzen, der MAK 1-41-C färbt die Tumorzellen (→) und deren astrozytäre Fortsätze (←), Gegenfärbung mit Hämalaun, x 480

D Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels monoklonaler Antikörper (MAK) gliom-assoziierte Antigene (GAA) charakterisiert. Die MAK stellten Fusionsprodukte aus Myelomzellen der Linie X63-Ag.8.653 und Milzzellen von Inzuchtmäusen dar, die mit den Gliomzelllinien 77DG-G-166 (Astrozytom/Hund), 83DG-G-422 (Oligodendrogliom/Hund) und 79FR-G-41 (Astrozytom/Ratte) immunisiert worden waren. Bezüglich der Bindungsspezifität war festzustellen, daß die MAK 5CC3, 6EB4, 10BD3, 11EC7, 19FF2, 22FF1, 32DF5, 45HD2, 1-41-A und 1-41-C keine Reaktivitäten gegenüber Normalgeweben zeigten, nur geringgradige Reaktivität mit normalen Zellen war bei 17EC5 festzustellen. Alle MAK reagierten mit anderen Tumorzelllinien neuroektodermalen Ursprungs.

Mit immunochemischer Färbung mittels MAK auf mit 1% SDS-Lösung behandeltem und elektrophoretisch aufgetrenntem Tumorzellmaterial konnten GAA im Molekulargewichtsbereich zwischen 40 und 157 kd dargestellt werden. Im einzelnen markierten bei der Tumorzelllinie 77DG-G-166 der MAK 5CC3 GAA von 95 kd, der MAK 10BD3 GAA von 40 kd und 83 kd, die MAK 11EC7 und 22FF1 GAA von 75 kd, 105 kd und 157 kd, bei der Tumorzelllinie 83DG-G-422 der MAK 19FF2 GAA von 99 kd und bei der Tumorzelllinie 79FR-G-41 markierten der MAK 1-41-C GAA von 42 kd und der MAK 1-41-A GAA von 54 kd und 110 kd. Durch weitere chemische Behandlung der Tumorzellpräparation konnte zudem festgestellt werden, daß es sich bei allen beschriebenen GAA um Glykoproteine - wofür auch ihre Hitzestabilität spricht - handelte, die über intermolekulare Disulfidbrücken verfügten. Der Glykoproteincharakter von GAA konnte durch eine Proteasebehandlung (Spaltung von Proteinen in kleinere Peptide und Aminosäuren) und durch Perjodatbehandlung (Spaltung von Kohlenhy-

dratringstrukturen) nachgewiesen werden, die Existenz von innermolekularen Disulfidbrücken durch Behandlung mit Mercaptoäthanol, die zur Spaltung von Disulfidbrücken führt. Nach den Behandlungen war keine Bindung von MAK mehr nachweisbar. Es konnte also - neben dem Nachweis zur Stoffklasse der GAA - gezeigt werden, daß nur die komplexe Struktur der GAA von den MAK erkannt wird, nicht jedoch kleinere Untereinheiten. Die Glykoproteine sind in der Zellmembran lokalisiert, wie durch serologische und histologische Untersuchungen festgestellt wurde, und zu beachten ist weiterhin, daß die Kohlenhydratgruppe am Protein eine Rolle bei der Bindung MAK/GAA spielen muß. Kohlenhydratgruppen sind mit durchschnittlich nur 2-10% am Gesamtmolekulargewicht von Membranglykoproteinen beteiligt und über eine Glykosidbindung an Protein gebunden. Aufgrund ihres hydrophilen Charakters ist die Kohlenhydratgruppe in der Regel peripher am Molekül gebunden und deshalb für die Reaktion mit dem Antikörper von großer Wichtigkeit (Stryer, 1985). Ausgehend von gleicher Menge Membranpräparation und MAK im Überschuß war bei den Färbungen festzustellen, daß sich die GAA als Banden unterschiedlich intensiv darstellten. Mit der Amino-Äthyl-Carbazol-Färbung stellten sich, mit Ausnahme des MAK 1-41-C, die Banden deutlich und breit dar. Bei der Immunogold-Silberfärbung waren die Banden eher dezent. Mit letzterer konnten noch geringe Menge an GAA nachgewiesen werden, wie beim MAK 1-41-A. Bei Vergleich der Sensitivität der Färbungen ist festzustellen, daß die Immunogold-Silberfärbung derjenigen mit Amino-Äthyl-Carbazol überlegen ist, ließen sich doch mit der Immunogold-Silberfärbung alle beschriebenen GAA darstellen, mit der Amino-Äthyl-Carbazol-Färbung nur 8 von 13 Banden, dies entspricht 61,5%. Grundlage dieser unterschiedlichen Banden-Intensität ist der unterschiedliche Gehalt der Tumorzellen an GAA, so

wurden die GAA, die bei der Tumorzelllinie 77DG-G-166 definiert wurden, vergleichsweise stärker exprimiert als die GAA der beiden anderen (83DG-G-422 und 79FR-G-41). Zwei Antikörper (11BD3 und 22FF1) markierten je drei vermutlich identische Banden. Die beiden Antikörper scheinen gegen das gleiche Epitop gerichtet zu sein, sie selbst sind jedoch nicht identisch (11EC7 ist ein IgG_{2b}, 22FF1 ein IgG₁). Von unterschiedlichen Antikörpern, die das gleiche Epitop erkennen, berichten Brown et al. (1981), Burchell et al. (1983), de Tribolet et al (1984) und Miotti et al. (1985). Die MAK 1-41-A, 10BD3, 11EC7 und 22FF1 markierten jeweils mehr als eine Bande, sie reagierten also mit GAA unterschiedlichen Molekulargewichts. Dies ist mit der Existenz von gleichen Epitopen auf Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts zu erklären (Lane et al., 1982; Bernal et al., 1984). Die antigenen Determinanten kamen, wie sich aus der Intensität der Banden erkennen ließ, annähernd in gleicher Häufigkeit vor. Eine Ausnahme stellte allerdings die von den MAK 11BD3 und 22FF1 markierte 75 kd-Bande bei der Tumorzelllinie 77DG-G-166 dar. Sie war nur mit der Immungold-Silberfärbung darstellbar und im Vergleich zu den Banden 105 kd und 157 kd dezent, wurde also von den Tumorzellen in vergleichsweise geringerem Ausmaß exprimiert. Zu den Molekulargewichtsangaben muß einschränkend gesagt werden, daß es sich dabei um Näherungswerte handelt. Glykoproteine binden weniger SDS als unkonjugierte Proteine. Sie zeigen deshalb aufgrund der geringeren negativen Ladung auch eine geringere Mobilität in der SDS-PAGE und täuschen so ein geringgradig höheres Molekulargewicht vor (Segrest et al., 1972; Deyl et al., 1983). Im Gegensatz zur bioche-

mischen Zusammensetzung hat die Tertiärstruktur von Proteinen nur wenig Einfluß auf deren Mobilität, da das SDS eine gleichartige Veränderung der Tertiärstruktur bewirkt (Segrest et al., 1972). Alle angeführten Faktoren können eine Meßungenauigkeit von maximal 10% bedingen (Weber et al., 1969; Steck et al., 1972).

Mit den MAK 6EB4, 17EC5, 32DF5 und 45HD2 konnten mit der Immunoblottechnik aufgrund fehlender Bandenbildung keine Ergebnisse erzielt werden. Die Immunreaktivität dieser Antikörper wurde mittels Affinitätschromatographie weiter untersucht. Damit konnten nur zwei Antikörpern, dem MAK 6EB4 im Molekulargewichtsbereich von 10-30 kd und dem MAK 17EC5 GAA im Molekulargewichtsbereich von 25-55 kd, GAA zugeordnet werden. In beiden Fällen konnten mit radioaktiver Markierung Proteinstrukturen dargestellt werden. Verglichen mit den Ergebnissen der Immunoblottechnik liegen die Molekulargewichtsangaben der Affinitätschromatographie in einem relativ weiten Bereich. Stellen sich, wie in diesem Fall, Proteine in der SDS-PAGE heterogen dar, so sind mehrere Erklärungen dafür möglich: Unterschiede im Kohlenhydratgehalt und im Gehalt an Sialinsäure oder Bindung von geladenen Liganden an das epitoptragende Protein (Vennegoor, 1985; Andrews, 1986). Die SDS-PAGE ist eine gebräuchliche und sehr sensitive Technik zur Proteinanalytik, es lassen sich aber mit ihr und mittels Immunoblottingtechnik auch Lipopolysaccharide nachweisen (Bradbury et al., 1984), so daß ein spezifischer Nachweis zur Stoffklasse der GAA nötig war. Er wurde mittels biochemischer Behandlung und radioaktiver Markierung erbracht.

Bei Vergleich der beiden angewandten Techniken zum Nachweis von GAA ist folgendes festzustellen:

- die Immunoblottechnik ist weniger aufwendig und liefert genaue Ergebnisse
- ist mit der Immunoblottechnik ein Nachweis von GAA nicht möglich, so kann die Affinitätschromatographie Ergebnisse liefern, die allerdings ungenauer sind.

In zwei Fällen konnten MAK keine korrespondierenden GAA zugeordnet werden, den MAK 32DF5 und 45HD2. Bezugnehmend auf Arbeiten von Saya et al. (1986) und Hakomori (1985) ist als Erklärung denkbar: die korrespondierenden GAA waren Glykolipide und mit der angewandten Technik nicht darstellbar oder aber so labil, daß sie bei der Membranpräparation zerstört wurden. Zum anderen ist die Tatsache interessant, daß alle Antikörper, denen GAA zugeordnet werden konnten zur IgG-Klasse gehören, die MAK 32DF5 und 45HD2 hingegen zu IgM. Diese unterschiedliche Zugehörigkeit zu Immunglobulin-klassen ist jedoch kein zwingender Grund für die fehlenden Ergebnisse. Immunblottechnik und Affinitätschromatographie lieferten auch mit IgM-Antikörpern Resultate (Bernal et al., 1984; Johnson et al., 1985).

Weiterhin konnte durch permanente Kontrollfärbungen mit MAK festgestellt werden, daß die charakterisierten GAA in über 100 in-vitro-Kultivationen über den Zeitraum eines Jahres exprimiert wurden. Sie wurden also von möglichen Veränderungen des Geno- und Phänotypus der Tumorzelllinien nicht betroffen und weiterhin in stabiler Form exprimiert.

Die bei anderen Tumorzelllinien beschriebene Heterogenität (Starkey et al., 1982; Laerum et al., 1983; Wikstrand et al., 1983; Heppner, 1984) konnte bei diesen Zelllinien, zumindest was die Expression der beschriebenen GAA betraf, nicht in diesem Ausmaß festgestellt werden. Aufgrund der gewonnenen Informationen bezüglich Molekulargewicht und

Stoffklasse kann über die funktionelle Bedeutung der GAA keine Aussage getroffen werden. Daß sie jedoch eine funktionelle Bedeutung besitzen, ist zumindest wahrscheinlich, da es sich bei einem Großteil der beschriebenen GAA um Glykoproteine handelt. Glykoproteine sind von großer Wichtigkeit bei interzellulärer Erkennung und Aggregation, des weiteren bei zellulären Adhäsionsvorgängen (Richter-Landsberg et al., 1983) und bei Zell-/Substrat-Reaktionen mit Fibronektin und anderen Mediatoren (Jvatt, 1984). Änderungen der Glykoproteine in ihrer biochemischen Zusammensetzung wie geringerer oder größerer Kohlenhydratanteil verglichen mit normalen Zellen bedingen Änderungen des 'sozialen' Verhaltens und der interzellulären Kommunikation (Poste et al., 1977; Ogata et al., 1980; Birkmayer, 1984). Daraus resultieren charakteristische Eigenschaften von Tumorzellen wie fehlende Kontaktinhibition, ausgeprägte aktive Beweglichkeit und Fähigkeit zur Metastasenbildung. Bei Vergleich der biochemischen Parameter der beschriebenen GAA und anderen Antigenstrukturen mit funktioneller Bedeutung bei normalen und neoplastischen Zellen fällt auf, daß es sich bei letzteren vorwiegend um solche Glykoproteine handelt, deren Molekulargewichte zwischen 10 und 150 kd liegen, mit einer Häufigkeit von Werten um 100 kd (Jvatt, 1984). Bei den beschriebenen TAA liegen ähnliche Verhältnisse vor, sodaß ihnen eine wie auch immer geartete funktionelle Bedeutung zukommen dürfte.

Abschließend muß noch festgestellt werden, daß mit den Untersuchungen GAA biochemisch definiert werden konnten, die als phänotypische Expression von unter onkogenem Einfluß veränderter genetischer Information anzusehen sind. Die Bedeutung genetischer Alterationen konnten Sager et al. (1985) mit der Beschreibung von Anti-Onkogenen (sie kommen in normaler DNS vor und unterdrücken eine Tumorentstehung)

und Lee et al. (1987) bei der Beschreibung des Retinoblastomgens herausstellen. Bei Fehlen des auf dem Chromosom 13 lokalisierten Gens kommt es zur Ausbildung eines Retinoblastoms. Das Retinoblastomgen stellt somit das erste beschriebene rezessive Krebsgen dar. Es steht somit im Gegensatz zu den dominanten Onkogenen (Slamon et al., 1987), unter deren Einfluß es zur Ausbildung von Tumoren kommt. Ohne die Bedeutung von biochemisch definierten GAA für Diagnosestellung und Therapie bei Tumoren schmälern zu wollen, ist daher zu berücksichtigen, daß eine biochemische Klassifikation von TAA ohne Aussage über deren Entstehung und funktionelle Bedeutung nur deskriptiven Charakter haben kann.

Die Ergebnisse zur Fragmentation von IgG-Molekülen bestätigen die Ergebnisse von Köhler et al. (1978b), Parham (1983). Parham konnte nachweisen, daß sich IgG₁ und IgG_{2a} symmetrisch in F(ab)₂- und kleinere Fragmente, IgG_{2b} zum Unterschied asymmetrisch in Fab/c- und kleinere Fragmente aufspalten. Köhler stellte fest, daß sich die schweren Ketten der verschiedenen IgG unterschiedlich darstellten, bei IgG₁ und IgG_{2a} als einzelne, bei IgG_{2b} als doppelte Banden. Bei IgG_{2b} liegen zwei ungleich schwere Ketten vor, dies ist bedingt durch ihren unterschiedlichen Gehalt an Kohlehydratgruppen. IgG_{2b} stellten sich gegenüber IgG₁ und IgG_{2a} in reduzierter und nicht reduzierter Form unterschiedlich dar, es ist daraus zu folgern, daß die IgG-Subklassen über unterschiedlich stabile inner- und zwischenkettige Disulfidbrücken verfügen müssen. Aufgrund dieser Befunde ist es möglich, IgG_{2b} von IgG₁ und IgG_{2a} zu unterscheiden.

E Zusammenfassung

In permanenten Zelllinien experimenteller und spontaner Gliome - zwei Astrocytome und ein Oligodendrogliom - wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper Antigene definiert und hinsichtlich Molekulargewicht und Stoffklasse näher charakterisiert.

Gliomzellen wurden unter Standardbedingungen gezüchtet. Nach Lysieren der Zellen und Sedimentation der Kerne wurden Membranen durch Ultrazentrifugation angereichert. Membranfraktionen wurden in Natriumdodecylsulfat solubilisiert, mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch Western-Blotting auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

Zur Detektion von GAA wurden die Nitrozellulosepräparate mit gliomspezifischen MAK inkubiert und Bindungsreaktionen immunochemisch durch Enzym-Substrat-Reaktion und Immungold-Silber-Färbung sichtbar gemacht. Vergleichend dazu wurden Membranfraktionen nach Affinitätschromatographie ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt und nach Kopplung mit ^{125}J radiographisch dargestellt.

Durch Reaktion mit sieben MAK konnten Banden im Bereich zwischen 40 und 157 kd markiert werden: Bei dem experimentellen Astrocytom drei Banden zwischen 42 und 110 kd, dem spontanen Astrocytom sechs Banden zwischen 40 und 157 kd und bei dem Oligodendrogliom eine Bande bei 99 kd. Darüberhinaus wurden antigene Membranfraktionen radiographisch im Bereich zwischen 10 und 30 kd sowie zwischen 25 und 55 kd nachgewiesen.

Alle durch MAK definierten GAA ließen sich nach Perjodat-, Pronase- und Mercaptoäthanol-Behandlung den Glykoproteinen zuordnen. Der Proteincharakter ließ sich zusätzlich durch positive Kopplungsreaktion mit ^{125}J bestätigen. Weiterhn konnte nachgewiesen werden, daß die GAA in über 100 in-vitro-Kultivationen konstant exprimiert wurden, quantitative Unterschiede im Vorkommen der einzelnen GAA bestehen und GAA mit gleichem Epitop auf Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts vorkommen.

Mit zwei MAK gelang eine Darstellung in der SDS-PAGE weder immunochemisch noch radioimmunologisch, was auf die Zugehörigkeit der korrespondierenden Antigene zu einer anderen Stoffklasse (Glykolipide?) hindeutet.

Summary

PARTIAL BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF GLIOMA-ASSOCIATED ANTIGENS

In permanent cell-lines of experimental and spontaneous gliomas - two astrocytomas and one oligodendroglioma - antigens have been defined by the means of monoclonal antibodies and their molecular weight and affiliation to a chemical category were characterized.

The glioma-cells were cultured under standard conditions. After cell lysis and sedimentation of the nuclei cell-membranes were concentrated by centrifugation. After solubilisation in sodium dodecyl sulfate the membranes were ripped in a polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes.

In order to detect glioma-associated antigens the nitrocellulose membranes were incubated with glioma-specific monoclonal antibodies and their contact was immunochemically visualized by enzyme-substratum-reaction. Parallel to that, after affinity chromatography fractions of membranes were conjugated with 125 Iodine and ripped in a polyacrylamide gel electrophoresis.

As a result it was possible to mark antibody-dependent binding sites ranging from 40 to 157 kd: with the experimental astrocytoma three binding sites ranging from 42 to 110 kd, with the spontaneous astrocytoma six binding sites from 40 to 157 kd and with the spontaneous oligodendroglioma a binding site of 99 kd. In addition to these results antigenic membrane fractions were demonstrated radiographically, one between 10 and 30 kd, another between 25 and 55 kd.

After treatment with periodate, pronase and mercaptoethanol all the antibody-defined glioma-associated antigens were classed with glycoproteins. The positive conjugation with 125 Iodine proved the protein character of the glioma-associated antigens, too. Furthermore it was demonstrated that the glioma-associated antigens were expressed constantly over the period of more than hundred in vitro cultures, there were quantitative differences concerning the occurrence of the glioma-associated antigens and in the end identical glioma-associated antigens were expressed on molecules of different molecular weight.

In two cases it was impossible, neither immunochemically nor radioimmunologically, to detect antibody-dependent antigens. Possibly, these antigens belong to the class of glycolipids.

F Literaturverzeichnis

Anderson, N.L., Nance, S.L., Pearson, T.W., Anderson, N.G.:
Specific antiserum staining of two-dimensional electrophoretic patterns of human plasma proteins immobilized on nitrocellulose

Electrophoresis 3, 135-142 (1982)

Andrews, A.T.:

Electrophoresis: theory, techniques and biochemical and clinical applications

Clarendon Press, Oxford, 1986

Ashwood-Smith, M.J.:

Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethylsulfoxide

Nature 190, 1204-1205 (1961)

Aumann, S.:

Experimentelle Untersuchungen zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität gegen spontane Gliome des Hundes

Diss. med. vet., München, 1986

Bernal, S.D., Speak, J.A.:

Membrane antigen in small cell carcinoma of the lung defined by monoclonal antibody SM1

Cancer Res. 44, 265-270 (1984)

Berson, G.:

Silver staining of proteins on polyacrylamide gels: increased sensitivity by a blue toning

Anal. Biochem. 134, 230-234 (1983)

Bertolotto, A.:

Glycosaminoglycan changes in human gliomas. A biochemical study.

J. Neurooncol. 4, 43-48 (1986)

Bilzer, T.:

Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis zellulärer Immunreaktionen gegen chemisch induzierte Gliome der Ratte

Diss. med. vet., München, 1980

Bilzer, T., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.:

Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and in vitro immune cytotoxicity

Anticancer Res. 2, 345-354 (1982)

Bilzer, T., Stavrou, D., Mellert, W.:
Cell-mediated lysis of glioma cells directed by monoclonal antibodies
Brit. J. Cancer 50, 563 (1984)

Bilzer, T.:
Depression of experimental intracranial glioma growth by antibody-carrying T-cells
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 109, A 21 (1985)

Birkmayer, J.G.D.:
Tumorbiologie
Karger Verlag, Basel/München, 1984

Blaszczysz, M., Pak, Y.K., Herlyn, M., Lindgren, J., Pessano, S., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Characterization of gastrointestinal tumor-associated carcinoembryonic antigen-related antigens defined by monoclonal antibodies
Cancer Res. 44, 245-253 (1984)

Bourdon, M.A., Coleman, R.E., Bigner, D.D.:
The potential of monoclonal antibodies as carriers of radiatin and drugs for immunodetection and therapy of brain tumors
Prog. Exp. Tumor Res. 28, 79-101 (1984)

Bourdon, M.A., Matthews, T.J., Pizzo, S.V., Bigner, D.D.:
Immunochemical and biochemical characterization of a glioma-associated extracellular matrix glycoprotein
J. Cell Biochem. 28, 183-197 (1985)

Bradbury, W.C., Mills, S.D., Preston, M.A., Barton, L.J., Penner, J.L.:
Detection of lipopolysaccharides in polyacrylamide gels by transfer to nitrocellulose followed by immunoautoradiography with antibody and ^{125}J -Protein-A: LPS-Blotting
Anal. Biochem. 137, 129-133 (1984)

Brown, J.P., Nishiyama, K., Hellström, I., Hellström, K.E.:
Structural characterization of human melanoma associated antigen p97 with monoclonal antibodies
J. Immunol. 127, 539-546 (1981)

Bubenik, J., Perlmann, P., Helmstein, K., Moberger, G.:
Cellular and humoral immune response to human urinary bladder carcinomas
Int. J. Cancer 5, 310-315 (1970)

Bumol, T.F., Reisfeld, R.A.:

Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cell

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 1245-1249 (1982)

Bullard, D.E., Bigner, D.D.:

Applications of monoclonal antibodies in the diagnosis and treatment of primary brain tumors

J. Neurosurg. 63, 2-16 (1985)

Burchell, J., Durbin, H., Taylor-Papadimitriou, J.:

Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells

J. Immunol. 131, 508-513 (1983)

Cahan, L.D., Irie, R.F., Singh, R., Cassidenti, A., Poulson, J.C.:

Identification of a neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD₂

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 7629-7633 (1982)

Cairncross, J.G., Mattes, M.J., Beresford, H.R., Albino, A.P., Houghton, A.N., Lloyd, K.O., Old, L.J.:

Cell surface antigens of human astrocytoma defined by mouse monoclonal antibodies: Identification of astrocytoma subsets

J. Immunol. 79, 5641-5645 (1982)

Carrel, S., deTribolet, N., Gross, N.:

Expression of HLA-DR and common acute lymphoblastic leukemia antigens on glioma cells

Eur. J. Immunol. 12, 354-357 (1982)

Carrel, S., Schmidt-Kessen, A., Mach, J.P., Heumann, D., Girardet, C.:

Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) on human malignant melanoma cell lines

J. Immunol. 130, 2456-2460 (1983)

Cheung, N.K., Lazarus, H., Miraldi, F.D., Abramowsky, C.R., Kallick, S., Saarinen, U.M., Spitzer T., Strandjord, S.E., Coccia, P.F., Berger, N.A.:

Ganglioside GD₂ specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma

J. Clin. Oncol. 5, 1430-1440 (1987)

Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindien, E.A., Pollok, L.A., Wood, W.C., Harnett, L.C.:

Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: In vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays
J. Nat. Canc. Inst. 64, 223-233 (1980)

Coakham, H.B., Brownell, B., Harper, E.J., Garson, J.A., Allan, P.M., Lane, E.B., Kemshead, J.T.:

Use of monoclonal antibody panel to identify malignant cells in cerebrospinal fluid
Lancet 2, 1095-1098 (1984)

Cornain, S., Carnaud, S., Silverman, D., Klein, E., Rajewsky, M.F.:

Spleen-cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specificity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes
Int. J. Cancer 16, 301-311 (1975)

Dahme, E., Müller, B., Schröder, B., Stavrou, D.:

Morphologische und zytochemische Befunde an zwei in vitro etablierten spontanen Hirntumoren des Hundes
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 21-27 (1980)

Daneels, G., Moeremans, M., deRaeymaeker, M., deMey, J.:

Sequential immunostaining (gold/silver) and complete protein staining (AuroDye) on Western blots
J. Immunol. Meth. 89, 89-91 (1986)

Davidson, R.L., Gerald, P.S.:

Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol
Somatic Cell Genet. 2, 165-176 (1976)

Deyl, Z.:

Electrophoresis: a survey of techniques and applications, part B: applications
Elsevier Scientific Publ. Comp., Amsterdam, 1983

Dippold, W.G., Knuth, A., Meyer zum Büschenfelde, K.H.:

Inhibition of human melanoma cell growth on vitro by monoclonal-anti-GD₃-ganglioside antibody
Cancer Res. 44, 806-810 (1984)

- Edwards, D.P., Grzyb, K.T., Dressler, L.G., Mansel, R.E., Zava, D.T., Sledge, G.W., McGuire, W.L.:
Monoclonal antibody identification and characterization of a Mr 43.000 membrane glycoprotein associated with human breast cancer
Cancer Res. 46, 1306-1317 (1986)
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., Gerstl, B.:
An acidic protein isolated from fibrous astrocytes
Brain Res. 28, 351-354 (1971)
- Epenetos, A.A., Courtenay-Luck, N., Pickering, D., Hooker, G., Durbin, H., Lavender, J.P., McKenzie, C.G.:
Antibody guided irradiation of brain glioma by arterial infusion of radioactive monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor and blood group A antigen
J. Brit. Med. 290, 1463-1466 (1985)
- Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.:
Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein-A-Sepharose
Immunochem. 15, 429-436 (1978)
- Farrands, P.A., Pimm, M.V., Embleton, M.J., Perkins, A.C., Hardy, J.D., Baldwin, R.W., Hardcastle, J.D.:
Radioimmuno-detection of human colorectal cancers by anti-tumor monoclonal antibody
Lancet 2, 387-400 (1982)
- Fazekas de St.Groth, S., Scheidegger, D.:
Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics
J. Immunol. Meth. 35, 1-21 (1980)
- Foley, E.J.:
Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin
Cancer Res. 13, 835-837 (1953)
- Fukaya, T., Hashimoto, K., Eto, H., Mehregan, A.:
Mouse monoclonal antibody (FKH1) detecting human melanoma-associated antigens
Cancer Res. 46, 5195-5200 (1986)
- Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C.:
Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines
Nature 266, 550-552 (1977)

Gatter, K.C., Abdulaziz, Z., Beverly, P., Corvalan, J.R.F., Ford, C., Lane, E.B., Mota, M., Nash, J.R.G., Pulford, K., Stein, H., Taylor-Papadimitriou, J., Woodhouse, C., Mason, D.Y.:

Use of monoclonal antibodies for the histopathological diagnosis of human malignancy

J. Clin. Pathol. 35, 1253-1267 (1982)

Ghose, T., Ramakrishnan, S., Kulkarni, P., Blair, A.H., Vaughan, K., Nolido, H., Norvell, S.T., Belitsky, P.:

Use of antibodies against tumor-associated antigens for cancer diagnosis and treatment

Transpl. Proc. 8, 1970-1972 (1981)

Goding, J.W.:

Antibody production by hybridomas

J. Immunol. Meth. 39, 285-308 (1980)

Goding, J.W.:

Monoclonal antibodies: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology

Academic Press, London/New York, 1983

Gross, L.:

Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line

Cancer Res. 3, 326-333 (1943)

Hakomori, S.:

Glycosphingolipids as differentiation and tumor markers and as regulators of cell proliferation

In: Wahren, B. (ed.): Molecular biology of tumor cells

Raven Press, New York, 139-156, 1985)

Hall, R.E.:

A monoclonal antibody (RH1-38) which inhibits multiple systems of cell-mediated cytotoxicity

Mol. Immunol. 22, 757-764 (1985)

Hallinan, F.M.:

Studies of silver staining of human parotid saliva protein polyacrylamide gel electrophoresis

Electrophoresis 4, 265-269 (1983)

Handman, E., Jarvis, H.M.:

Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: mechanism of binding to nitrocellulose

J. Immunol. Meth. 83, 113-123 (1985)

Hellström, J., Hellström, K.E., Pierce, G.E., Bill, A.H.:
Demonstration of cell bound and humoral immunity against
neuroblastoma cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 1231-1238 (1968)

Helson, L., Helson, C., Weinberger, C.:
DW-1 monoclonal antibody and neuroectodermal tumors
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 24, 130 (1983)

Heppner, G.H.:
Tumor heterogeneity
Cancer Res. 44, 2259-2265 (1984)

Herbermann, R.B.:
Immunoigenicity of tumor antigens
Biochem. Biophys. Acta 473, 93-119 (1977)

Herlyn, M., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Antigens detected by monoclonal antibodies against human
melanoma
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 21, 210 (1980)

Heukeshoven, J., Dernick, R.:
Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung in
Polyacrylamidgelen: Bemerkungen zum Mechanismus der Sil-
berfärbung
Elektrophorese Forum '83 (Radola, B.J., Hrsg.) München,
92-97, 1983

Houghton, A.N., Brooks, H., Cote, R.J., Taormina, M.C.,
Oettgen, H.F., Old, L.F.:
Detection of cell surface and intracellular antigens by
human monoclonal antibodies
J. Exp. Med. 158, 53-65 (1983)

Houghton, A.N., Scheinberg, D.A.:
Monoclonal antibodies: potential applications to the treat-
ment of cancer
Seminars in Oncology 13, 165-179 (1986)

Ivatt, R.J.:
The biology of glycoproteins
Plenum Press, New York, 1984

Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Elder, J.H.:
Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis
of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose
Gene Anal. Techn. 1, 3-8 (1984)

Johnson, P., Williams, A.F., Woollett, G.R.:
Purification of membrane glycoproteins with monoclonal antibody affinity columns
in: Springer, A.T. (ed.): Hybridoma technology in the bio-sciences and medicine, Plenum Press, New York, 163-175, 1985

Jonak, Z.L.:
Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation
In: Kennett, R.H. (ed.): Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 1980

Kahan, B.D., Reisfeld, R.A.:
Extraction and purification of soluble histocompatibility antigens
Transpl. Rev. 6, 88-96 (1971)

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.:
A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines
J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

Kemshead, J.T., Fritschy, J., Garson, J.A., Allan, P., Coakham, H., Brown, S., Asser, U.:
Monoclonal antibody UJ 127:11 detects a 220,000-240,000 dal glycoprotein present on a subset of neuroectodermally derived cells
Int. J. Cancer 31, 187-195 (1983)

Kennett, R.H., Gilbert, F.:
Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain
Science 203, 1120-1121 (1979)

Kennett, R.H., Jonak, Z.L., Bechtol, K.B.:
Characterization of antigens with monoclonal antibodies
in: Evans, A. (ed.): Advances in Neuroblastoma Research, Raven Press New York, 209-219, 1980a

Kennett, R.H., Jonak, Z.L., Bechtol, K.B.:
Monoclonal antibodies against tumor-associated antigens
in: Kennett, R.H. (ed.): Monoclonal antibodies, Plenum Press, New York, 155-167, 1980b

- Khoda, H., Uede, T.; Yamaki, T., Ibayashi, Y., Sugawara, H., Kikuchi, K.:
Immunobiological and biochemical characterization of solubilized rat gliosarcoma cell tumor-associated transplantation antigens
Jpn. J. Cancer Res. 77, 833-842 (1986)
- Klein, G.:
Tumor antigens
Amer. Rev. Microbiol. 20, 223-252 (1966)
- Köhler, G., Milstein, C.:
Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity
Nature 256, 495-497 (1975)
- Köhler, G., Shulman, M.J.:
Cellular and molecular restrictions of lymphocyte fusion
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 143-151 (1978a)
- Köhler, G., Hengartner, H., Shulman, M.J.:
Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas
Eur. J. Immunol. 8, 82-88 (1978b)
- Koprowski, H., Herlyn, D., Lubeck, M., DeFreitas, E., Sears, H.F.:
Human anti-idiotypic antibodies in cancer patients: is the modulation of the immune response beneficial for the patient?
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81, 216-219 (1984)
- Kyhse-Anderson, J.:
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose
J. Biophys. Biochem. Meth. 10, 203-209 (1985)
- Laemmli, U.K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685 (1970)
- Laerum, O.D., Mork, S., Rajewski, M.S., Hansteen, J.L., Hangen, A.:
Heterogeneity and selection of neoplastic neurogenic rat cells in vivo and in vitro
Anticancer Res. 3, 187-194 (1983)

Lampson, L.A., Hickey, W.F.:

Monoclonal antibody analysis of MHC expression in human brain biopsies: tissue ranging from histologically normal to that showing different levels of glial tumor involvement
J. Immunol. 136. 4054-4062 (1986)

Lane, D., Koprowski, H.:

Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies

Nature 296, 200-202 (1982)

Lee, V.M., Page, C.D., Wu, H., Schlaepfer, W.W.:

Monoclonal antibodies to gel-excised glial filament protein and their reactivities with other intermediate filament proteins

J. Neurochem. 42, 25-32 (1984)

Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y., Lee, E.Y.H.:

Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence

Science 235. 1394-1399 (1987)

Lemke, H., Hämmerling, G.J., Höhmann, C., Rajewsky, K.:

Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody specific for major histocompatibility antigens of the mouse

Nature 271, 249-251 (1978)

Lemonnier, F., Burakoff, S.J., Germain, R., Benacerraf, B.:
Cytolytic thymus-derived lymphocytes for allogenic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1229-1233 (1977)

Lindmo, T., Davies, C., Rofstad, E., Fodstad, O., Sundan, A.:

Antigen expression in human melanoma cells in relation to growth conditions and cell-cycle distribution

Int. J. Cancer 33, 167-171 (1984)

Littlefield, J.W.:

Selection of hybrids from mastings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinations

Science 145, 709 (1964)

Luner, S.J., Ghose, T., Chatterjee, S., Cruz, H.N., Belitsky, P.:

Monoclonal antibodies to kidney and tumor-associated surface antigens of human renal cell carcinoma

Cancer Res. 46, 5816-5820 (1986a)

Luner, S.J., deVellis, J.:

Immunoprecipitation of a Mr 64,000 glial tumor-associated antigen by monoclonal antibody 217c
Cancer Res. 46, 863-865 (1986b)

Magnani, J.L., Brockhaus, M., Smith, D.F., Ginsburg, V., Blaszczyk, M., Mitchell, K., Stepkowski, Z., Koprowski, H.:
A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma
Science 212, 55-56 (1981)

Masuko, T., Yagita, H., Hashimoto, Y.:

Monoclonal antibodies against cell surface antigens present on human urinary bladder cancer cells
J. Nat. Canc. Inst. 72, 523-530 (1984)

Micheel, B.:

Antigenstruktur der Zellmembran
in: Pasternak, G., Schneeweiß, U. (Hrsg.): Transplantations- und Tumorummunologie, Gustav Fischer Verlag, Jena, 163-180, 1973

Milleck, J.:

Immunologische Abwehr und Krebs
Akademie-Verlag, Berlin, 1984

Miotti, S., Aguanno, S., Canevari, S., Diotti, A., Orlandi, R., Soumino, S., Colnaghi, M.J.:

Biochemical analysis of human ovarian cancer-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies
Cancer Res. 45, 826-832 (1985)

Momoi, M., Kennett, R.H., Glick, M.C.:

A membrane glycoprotein from human neuroblastoma cells isolated with the use of monoclonal antibody
J. biol. Chem. 255, 11914-11921 (1980)

Moore, B.W.:

A soluble protein characteristic of the nervous system
Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 739-744 (1965)

Müller, B.:

In vitro Etablierung und partielle Charakterisierung von zwei spontanen Hirntumoren des Hundes
Diss. med. vet., München, 1978

Narayan, R.K., Heydorn, W.E., Creed, G.J., Jacobowitz, D.:
Protein patterns in various malignant human brain tumors by two-dimensional gel electrophoresis
Cancer Res. 46, 4685-4695 (1986)

Natali, P.G., Imai, K., Wilson, B.S., Bigotti, A., Cavaliere, R., Pellegrino, M.A., Ferrone, S.:
Structural properties and tissue distribution of the antigen recognized by the monoclonal antibody 653.40S to human melanoma cells
J. Nat. Canc. Inst. 67, 591-601 (1981)

Nexo, B.A.:

A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies
Virology 77, 849-852 (1977)

Nurminen, M., Zaleska, M.:

Surface labelling

in: Korhonen, T.K. (ed.): Enterobacterial surface antigens: methods for molecular characterization, Elsevier Scientific Publ. Comp., Amsterdam, 252-257, 1985

Ogata, S., Ueda, R., Lloyd, K.O.:

Comparison of [³H] glucosamine-labeled glycoproteins from human renal cancer and normal kidney epithel cell cultures by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 770-774 (1981)

Oger, J., Szuchet, S., Antel, J., Arnason, B.G.W.:

A monoclonal antibody against human T suppressor lymphocytes binds specially to the surface of cultures oligodendrocytes
Nature 295, 66-68 (1982)

Ohkubo, M., Sawada, K., Sakiyama, S.:

Enhanced expression of a 37,000-dalton protein in human lung cancers
Jpn. J. Cancer Res. 77, 546-553 (1986)

Old, L.J., Boyse, E.A.:

Immunology of experimental tumors
Amer. Rev. Med. 15, 167-186 (1969)

Old, L.J.:

Cancer immunology: the search for specificity
Cancer Res. 41, 361-375 (1981)

Ouchterlony, Ö.:

Diffusion-in-gel-methods for immunological analysis II
Prog. Allergy 6, 30-154 (1962)

Parham, P.:

On the fragmentation of monoclonal IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} from Balb/c mice

J. Immunol. 131, 2895-2902 (1983)

Parish, C.R., O'Neill, H., McKenzie, J.F.C.:

A new procedure for analysing the relationship between different cell surface antigens

J. Immunol. Meth. 39, 223-232 (1980)

Pateraki, E., Guesdon, J.L., Serie, C., Avrameas, S.:

Terelisa: the Elisa test performed in Terasaki plates

J. Immunol. Meth. 46, 361-368 (1981)

Paulie, S., Koho, H., Ben-Aissa, H., Hansson, Y., Lundblad, M.L., Perlmann, P.:

Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder

Cancer Immunol. Immunother. 17, 173-179 (1984)

Peters, J.H., Baumgarten, H., Schulze, M.:

Monoklonale Antikörper

Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York/Tokio, 1985

Pfizenmaier, K., Nagel, G.A.:

Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie

Dtsch. med. Wschr. 110, 615-617 (1985)

Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H.F., Old, L.J.:

Serological analysis of cell surface antigens of human malignant brain tumors

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 5122-5126 (1978)

Pfreundschuh, M., Röhrich, M., Piotrowski, W., Berlit, P., Penzholz, H.:

Natural antibodies to cell-surface antigens of human astrocytoma

Int. J. Cancer 29, 517-521 (1982)

Poste, G., Nicolson, G.L.:

The synthesis, assembly and turnover of cell surface components

Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1977

Prehn, R.T., Main, J.M.:

Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas

J. Nat. Canc. Inst. 18, 769-778 (1957)

Price, M.R., Edwards, S., Powell, M., Baldwin, R.W.:
Epitope analysis of monoclonal antibody NCRC-11 defined
antigen isolated from human ovarian and breast carcinomas
Br. J. Cancer 54, 393-400 (1986)

Pukel, C.S., Lloyd, K.O., Travassos, L.R., Dippold, W.G.,
Oettgen, H.F., Old, L.J.:
GD₃, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection
and characterization by mouse monoclonal antibody
J. Exp. Med. 155, 1133-1138 (1982)

Rathjen, F.G.:
Immunologische Charakterisierung von an der Zelladhäsion
beteiligten Glykoproteinen im Mausnervensystem
Diss. rer. nat., Heidelberg, 1982

Richter-Landsberg, C., Duskin, D.:
Role of glycoproteins in neuronal differentiation
Exp. Cell Res. 149, 335-345 (1983)

Roberts, J.D., Caserio, M.C.:
Basic principles of organic chemistry
W.A. Benjamin Inc., New York, 1965

Ross, A.H., Mitchell, K.F., Steplewski, Z., Koprowski, H.:
Identification and isolation of melanoma-associated anti-
gens with monoclonal antibodies
Hybridoma 1, 413-421 (1982)

Sager, R., Craig, R.W.:
Anti-oncogenes and the suppression of tumor formation
Cancer cells 3, 95-100 (1985)

Saxton, R.E., Torbett, M., Nestor, M., Fairhurst, M., Coch-
ran, A.J., Eilber, F.R., Burk, M.W.:
Four distinct melanoma cell surface antigens defined by
monoclonal antibodies
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 24, 894 (1983)

Saya, H., Masuko, T., Kokunai, T., Yagita, H., Ijida, A.,
Taomoto, K., Tamaki, N., Matsumoto, S., Hashimoto, Y.:
Detection of human glioma-associated antigen by rat mono-
clonal antibody raised against syngeneic rat glioma cells
J. Neurosurg. 65, 495-502 (1986)

Schimmelpfennig, L., Langenberg, U., Peters, H.:
Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in
vitro
Nature 285, 661-662 (1980)

Schmitt, H.D.:

Produktion und immunochemische Darstellung der Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen spontane Hirntumoren des Hundes

Diss. med. vet., München, 1986

Schönmann, S.M., Iyer, J., Laeng, H., Gerber, H.A., Käser, H., Blaser, K.:

Production and characterization of monoclonal antibodies against human neuroblastoma

Int. J. Cancer 37, 255-262 (1986)

Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.:

Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma, and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies

Cancer Res. 41, 2714-2717 (1981)

Seeger, R.C., Danon, Y.L., Rayner, S.A., Hoover, S.:

Definition of Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarkoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody

J. Immunol. 128, 983-989 (1982)

Segrest, J.P., Jackson, R.L.:

Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate

Meth. Enzymol. 28, 54-63 (1972)

Sikora, K., Alderson, T.:

Human hybridomas from malignant gliomas

Lancet 2, 11-14 (1982)

Singer, S.J., Nicolson, G.L.:

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes

Science 175, 720-731 (1972)

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L.:

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene

Science 235, 177-182 (1987)

Solheid, C., Lauro, G., Palladine, G.:

Two separate membrane-bound antigens on human glioma cells in tissue immunofluorescence

J. Neurol. Sci. 30, 55-64 (1976)

Starkey, J. R., Davies, W.C., Talmadge, J.E.:
Immunoselection of tumor variants resistant to antibody-mediated cytotoxicity
Cancer Immunol. Immunother. 14, 124-131 (1982)

Stavrou, D., Elling, H., Haglid, K.G.:
Demonstration of humoral antibodies against autologous cells in experimental rabbit gliomas
J. Neuropath. Exp. Neurol. 37, 694 (1978a)

Stavrou, D., Anzil, A.P., Elling, H.:
Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas
Acta Neuropathol. 43, 111-117 (1978b)

Stavrou, D., Hulten, M., Anzil, A.P., Bilzer, T.:
The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells
Int. J. Cancer 26, 629-637 (1980)

Stavrou, D., Bilzer, T., Hulten, M.:
Protektiver Effekt gegen syngene Gliomtransplantate durch Immunisierung mit chemisch modifizierten Gliomzellen
Zbl. allg. Path. 125, 572 (1981)

Stavrou, D., Süss, C., Bilzer, T., Kummer, U., deTribolet, N.:
Monoclonal antibodies reactive glioma cell lines derived from experimental brain tumors
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1439-1449 (1983)

Stavrou, D., Mellert, W., Bilzer, T., Senekowitsch, R., Keiditsch, E., Mehrain, P.:
Radioimmunodetection of gliomas by administration of radio-labelled monoclonal antibodies. Experimental data
Anticancer Res. 5, 147-156 (1985)

Stavrou, D., Mellert, W., Mellert, U., Keiditsch, E., Bise, K., Mehrain, P.:
Growth inhibition of experimental glioma grafts by monoclonal antibody treatment
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 112, 111-118 (1986a)

Stavrou, D., Glässner, H., Bilzer, T., Senekowitsch, R., Keiditsch, E., Mehrain, P.:
Radioimaging of experimental glioma grafts using F(ab)₂-fragments of monoclonal antibodies
Anticancer Res. 6, 897-904 (1986b)

- Steck, T.L.:
Membrane molecular biology
Sinauer Ass. Inc., London, 1972
- Sternberger, L.A.:
Some new developments in immunocytochemistry
Microscopy 25, 346-361 (1969)
- Stryer, L.:
Biochemische Membranen
in: Biochemie, Vieweg Verlag, Wiesbaden, 160-182, 1985
- Tizard, J.R.:
Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie
Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg, 1981
- Tobin, S.:
Charakterisierung eines Leukozyten-Antigens beim Haushuhn
Diss. med. vet., München, 1987
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.:
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide
gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applica-
tions
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)
- Towbin, H., Gordon, J.:
Immunoblotting and dot immunobinding - current status and
outlook
J. Immunol. Meth. 72, 313-340 (1984)
- deTribolet, N., DeMuralt, B., Diserens, A.C.:
Reactivity spectrum of monoclonal antibodies to human gliomas
J. Neuroimmunol. 4, 239 (1982)
- deTribolet, N., Carrel, S., Mach, J.P.:
Brain tumor-associated antigens
Prog. Exp. Tumor Res. 27, 118-131 (1984)
- Ueda, R., Ogata, S.J., Morrissey, D.M., Finstad, C.L., Sz-
kudlarek, J., Whitmore, W.F., Oettgen, H.F., Lloyd, K.O.,
Old, L.J.:
Cell surface antigens of human renal cancer defined by mouse
monoclonal antibodies: identification of tissue-specific
kidney glycoproteins
Proc. Nat. Acad. Sci, USA 78, 5122-5126 (1981)

Varki, N.M., Reisfeld, R.A., Walker, L.E.:
Antigens associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies
Cancer Res. 44, 681-687 (1984)

Vennegoor, C., Calafat, J., Hageman, P., van Buttenen, F. Janssen, H., Kolk, A., Rümke, P.:
Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-resistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NKI/C-3
Int. J. Cancer 35, 287-296 (1985)

Vessella, R.L., Moon, T.D., Chion, R.K., Nowak, J.A., Arfman, E.W., Palme, D.F., Peterson, G.A., Lange, P.H.:
Monoclonal antibodies to human renal cell carcinoma: recognition of shared and restricted tissue antigens
Cancer Res. 45, 6131-6139 (1985)

Vogel, C.M.:
Immunoconjugates - antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer
Oxford University Press, New York/Oxford, 1987

Wahlström, T., Saksela, E., Troupp, H.:
Cell bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of the brain
Cell Immunol. 6, 161-170 (1973)

Warnatz, H.:
Tumorimmunologie
Thieme Verlag, Stuttgart, 1975

Weber, K., Osborne, M.:
The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis
J. biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:
Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies
Cancer Res. 42, 267-275 (1982)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:
Demonstration of complex antigenic heterogeneity in human glioma cell line and eight derived clones by specific monoclonal antibodies
Cancer Res. 43, 3327-3334 (1983)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.:

Use of monoclonal antibodies in neurobiology and neurooncology

in: Seel, S., Reisfeld, R. (eds.): Monoclonal antibodies in cancer, Humana Press, Clifton/New Jersey, 365-397, 1985

Wilson, B.S., Ruberto, G., Ferrone, S.:

Immunochemical characterization of human high molecular weight-melanoma associated antigen identified with monoclonal antibodies

Cancer Immunol. Immunother. 14, 196-201 (1983)

Wilson, C.M.:

Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis

Anal. Biochem. 96, 263-278 (1979)

Woodbury, R.G., Brown, J.P., Yeh, M.Y., Hellström, J., Hellström, K.E.:

Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2183-2187 (1980)

Herrn Prof. E. Dahme danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut.

Herrn Dr. Th. Bilzer gilt mein besonderer Dank für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Für ihre technische Unterstützung bedanke ich mich bei Frau D. Wallmann, Frau A. Lechner und allen anderen Mitarbeitern des Instituts.

Frau I. Schraner vom Institut für Physiologie und Herrn G. Reidel von der Abteilung für Nuklearbiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, waren mir bei der Durchführung der Experimente eine wertvolle Hilfe.

Nicht zuletzt danke ich meiner Kollegin B. Martin für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch allen Ungenannten, die in verschiedenster Weise zum Gelingen der Dissertation beitrugen, möchte ich an dieser Stelle danken.

Lebenslauf

- 1957 geboren am 17.März in München
 Vater: Karl Minkus, Oberamtsrat
 Mutter: Julianna Minkus, geb. Schreil
- 1963-1967 Besuch der Grundschule in München-Fürstenried
- 1967-1976 Besuch des Thomas-Mann-Gymnasiums in München-Fürstenried
 Reifezeugnis am 25.Juni 1976
- 1976-1980 Lehre als Kachelofen- und Luftheizungsbauer
 Gesellenbrief am 27.Juli 1979
- 1980-1986 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Approbation als Tierarzt am 25.September 1986
- 1986-1987 Dissertation am Institut für Tierpathologie und Neuropathologie (Professor Dr. E. Dahme) der Universität München
- 1987 15.Mai - 30.November 1987 Teilzeitanstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierpathologie der Universität München

